AMILTON CESAR DOS SANTOS

**Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-
citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -
hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea
spixii*, Wagler, 1831)**

São Paulo

2012

AMILTON CESAR DOS SANTOS

Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
29/10/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2662
FMVZ

Santos, Amilton Cesar dos

Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831) / Amilton Cesar dos Santos. -- 2012.
118 f., il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. Ciclo estral. 2. Esteroidogênese. 3. Membrana de oclusão vaginal. 4. Mucosa vaginal. 5. Roedores silvestres. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)", protocolado sob o nº 2400/2011, utilizando 10 (dez) preás, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio Claves de Assis Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Expression of enzymes: cytochrome p450 aromatase and NADPH-cytochrome p450 reductase and cytochrome p450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-lyase) in the vagina of females of cavy (*Galea spixii*, Wagler, 1831)", protocol number 2400/2011, utilizing 10 (ten) cavy, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Claves de Assis Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Amilton Cesar dos

Título: Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, nadph-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

(SANTOS, 2012)

Preá silvestre do semiárido

Galea spixii

Dedicatória

Aos meus pais, Paulo Cesar dos Santos e Nair Zanelli por me deixarem sempre livre pra fazer minhas escolhas.

Aos meus irmãos Paulo Cesar dos Santos e Elaine Cristina dos Santos, pela nossa união e por sempre me incentivarem e acreditarem em minhas escolhas.

A minha cunhada e madrinha Roselena Rodrigues dos Santos e meu cunhado Israel Moura por sempre acreditarem no meu potencial e pela eterna torcida pra que tudo sempre desse certo em minha vida.

A Vanessa Gomes por acreditar no meu trabalho e me incentivar nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, por me auxiliar na escolha e execução desta pesquisa e me dar oportunidades de participar de outros inúmeros projetos.

Agradecimentos

Aos irmãos de orientação Bertassoli, Vitorinha, M.A., Delys, Paulo, Bragança (minha companheira da humilde residência) e Diego Maranhão por todas as aventuras emocionais boas e ruins compartilhadas ao longo dessa pesquisa.

Ao grande amigo Bruno Vasconcelos (minero, berlândia, padrim, tio, sócio, cumpanhero, etc), pela grande amizade e parceria em pesquisas, todas conquistadas durante o período de elaboração deste projeto, e por estar sempre disposto a me ajudar nos momentos de dificuldades.

A amiga Cris Cagnoni (canelone) pela amizade e incalculável carinho.

A grande e insubstituível amiga e instrutora de técnica de imunohistoquímica Juliana Ferrão, sem a qual esta pesquisa não teria fim.

A prof. Dr. Maria Angélica Miglino pela oportunidade não só de ingressar no programa de pós-graduação, mas por me permitir realizar um sonho.

A prof. Dr. Paula Papa por abrir as portas de seu laboratório para meu aprendizado e treinamento de técnicas utilizadas nesta e em outras pesquisas, e por estar sempre aberta a me ajudar a solucionar dúvidas e superar dificuldades.

Ao prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira por me acolher em sua casa e fornecer o material desta pesquisa, além de fornecer acomodações durante meu período de coleta na UFRSA- Mossóro, RN.

Aos demais professores do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Alan Peres de Melo, Francisco Javier Hernandez-Blázquez, José Roberto Kfour Jr, e Pedro Primo Bombonato pelas aulas em disciplinas e por estarem sempre dispostos a sanar minhas dúvidas.

A prof. Dr. Rose Ely Grassi Ricci pela paciência e apoio na documentação dos meus resultados.

Ao amigo Ronaldo Agostinho da Silva pelas risadas e bons momentos compartilhados durante a execução do material de histologia no Laboratório de Embriologia e Histologia do departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP.

Aos funcionários Maicon Barbosa da Silva e Jaqueline Martins de Santana pela colaboração sempre que requisitados.

A FAPESP- Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo pelo financiamento do projeto por meio de bolsa de auxílio regular a pesquisa em Mestrado

**Nada te perturbe,
Nada te amedronte.
Tudo passa;
A paciência tudo alcança.
A quem tem Deus nada falta,
Só seu amor nos basta.**

(Santa Tereza D'Ávila)

RESUMO

SANTOS, A. C. Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831). [Enzymes expression: of the cytochrome P450 aromatase, NADPH-cytochrome P450 redutase and cytochrome P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-lyase) in the vagina of female cavies (*Galea spixii*, Wagler, 1831)]. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Para a metabolização de hormônios esteroides sexuais é essencial a participação de enzimas esteroidogênicas. A enzima citocromo P450c17 é responsável pela produção de andrógenos e a enzima citocromo P450 aromatase é responsável pela produção de estrógenos, sendo que, ambas as enzimas necessitam formar um complexo com uma enzima parceira, denominada NADPH citocromo P450 redutase, para realizar a metabolização destes hormônios essenciais para a diferenciação sexual. Objetivou-se imunolocalizar as três enzimas acima citadas no tecido vaginal de fêmeas de roedores *Galea spixii*. Para tanto, o experimento foi desenvolvido utilizando técnicas de citologia esfoliativa vaginal para definição das fases do ciclo estral, técnicas de microscopia de Luz, Eletrônica de Varredura e testes de imunohistoquímica para detecção das enzimas: citocromo P450c17, citocromo P450 aromatase, e NADPH citocromo P450 redutase. Constatou-se no presente estudo que o ciclo estral das fêmeas de preás silvestres do semiárido apresenta ciclo estral com duração de $15,85 \pm 1,4$ dias, com a formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal durante cada ciclo estral. A vagina apresenta um clitóris hipertrofiado com o óstio uretral que se abre no topo do mesmo, e ausência de um vestíbulo vaginal. O epitélio da mucosa vaginal sofre modificações proliferativas, se espessando e se adelgando de acordo com a respectiva fase do ciclo estral. As enzimas citocromo P450 aromatase e NADPH redutase estão imunolocalizadas durante todo o ciclo estral no epitélio e tecido conjuntivo da vagina de *Galea spixii*. Por outro lado, a enzima P450c17 está imunolocalizada no epitélio vaginal durante todas as fases do ciclo estral, porém não está presente no estro. Com estes dados pode-se sugerir que ocorre uma metabolização local de hormônios estrógenos e andrógenos no tecido vaginal o que podem estar relacionado com a proliferação celular, variação na vascularização e inervação e ruptura da membrana de oclusão vaginal.

Palavras-chave: Ciclo estral. Esteroidogênese. Membrana de oclusão vaginal. Mucosa vaginal. Roedores silvestres.

ABSTRACT

SANTOS, A. C. Enzymes expression: of the cytochrome P450 aromatase, NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) in the vagina of female cavies (*Galea spixii*, Wagler, 1831). [Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)]. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

To the metabolism of sex steroid hormones is essential the participation of esteroidogenic enzymes. The enzyme cytochrome P450c17 is responsible for androgen production; and the enzyme aromatase cytochrome P450 is responsible for estrogen production, however, both enzymes require forming a complex with an enzyme partner called NADPH cytochrome P450 reductase to perform the metabolism of these hormones, which are essential for sexual differentiation. This study aimed to immunolocalization of the three enzymes above mentioned in the vaginal tissue from female rodents *Galea spixii*. Therefore, the experiment was carried out using vaginal cytology techniques for definition of the estrous cycle phases, techniques for light microscopy, scanning electron and immunohistochemical tests for the detection of enzymes: cytochrome P450c17, cytochrome P450 aromatase, and NADPH cytochrome P450 reductase. It was found that the estrus cycle of *Galea spixii* female lasts 15.85 ± 1.4 days, with the formation and rupture of vaginal closure membrane during each oestrous cycle. The vagina has a hypertrophied clitoris with the urethral orifice that opens on top of it, and it is observed the absence of a vaginal vestibule. The vaginal mucosal epithelium undergoes proliferative changes, with thickening and thinning according to the respective estrous cycle phase. The enzymes cytochrome P450 aromatase and NADPH reductase are immunolocalized throughout the oestrous cycle in the epithelium and connective tissue of the vagina from *Galea spixii*. On the other hand, the enzyme cytochrome P450c17 is immune located in the vaginal epithelium during all stages of the estrous cycle, except at estrous. With these data may be suggested that there is a local estrogens and androgens metabolism in vaginal tissue which may be associated with cell proliferation, vascularization and innervation variation besides the formation and rupture of the vaginal closure membrane.

Keywords: Estrous cycle. Steroidogenesis. Vaginal closure membrane. Vaginal mucosa. Wild rodents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de uma fêmea adulta de <i>Galea spixii</i> criada em cativeiro.....	24
Figura 2 - Esquema demonstrativo das vias de síntese de hormônios esteroides sexuais....	38
Figura 3 - Fotografia de um Box para criação de animais silvestres do CEMAS-UFERSA	50
Figura 4 - Esquema da divisão dos grupos experimentais.....	50
Figura 5 - Esquema do método adotado para identificação das fêmeas de preás.....	51
Figura 6 - Esquema demonstrativo da coleta dos esfregaços vaginais em <i>Galea spixii</i>	54
Figura 7 - Gráfico demonstrativo da porcentagem de ciclos estral em <i>Galea spixii</i> de acordo com sua duração	60
Figura 8 - Fotomicrografia dos tipos celulares dos esfregaços vaginais em <i>Galea spixii</i> ...	61
Figura 9 - Gráfico de porcentagem de células do esfregaço vaginal entre as diferentes durações de ciclo estral em <i>Galea spixii</i>	62
Figura 10 - Fotografia macroscópica da vulva e clitóris de <i>Galea spixii</i>	63
Figura 11– Fotografia do aparelho urogenital e adrenal de fêmeas de <i>Galea spixii</i>	65
Figura 12 - Fotomicrografia das variações do epitélio da mucosa vaginal em <i>Galea spixii</i>	67
Figura 13 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> corado em HE.....	68
Figura 14 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> corado em Tricromo de Masson....	69
Figura 15 - Fotomicrografia do óstio da vagina de <i>Galea spixii</i> corado em Picrosírius	70
Figura 16 - Fotomicrografia da vagina e clitóris de <i>Galea spixii</i> corado em HE.....	71
Figura 17 - Fotomicrografia da vulva de <i>Galea spixii</i> corado em HE	71
Figura 18 - Fotomicrografia da vulva de <i>Galea spixii</i> corado em Tricromo de Masson	73

Figura 19 - Eletromicrografia de varredura da vagina, vulva e clitóris das fêmeas de <i>Galea spixii</i>	74
Figura 20 - Eletromicrografia de varredura da vagina, vulva e clitóris de <i>Galea spixii</i>	75
Figura 21- Fotomicrografia do ovário de <i>Galea spixii</i> utilizados como tecido controle com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	77
Figura 22 - Fotomicrografia do tecido adiposo da camada adventícia da vagina de <i>Galea spixii</i> com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.....	78
Figura 23 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	79
Figura 24 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	80
Figura 25 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	81
Figura 26- Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em diestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	82
Figura 27 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em proestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	83
Figura 28 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em estro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase	84
Figura 29 - Fotomicrografia do ovário de <i>Galea spixii</i> utilizados como tecido controle com imunocoloração para citocromo P450c17	85
Figura 30 - Fotomicrografia do tecido adiposo da vagina de <i>Galea spixii</i> com imunocoloração para citocromo P450c17	86
Figura 31 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para citocromo P450c17	87

Figura 32 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para citocromo P450c17.....	88
Figura 33 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em diestro com imunocoloração para citocromo P450c17	89
Figura 34 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em proestro com imunocoloração para citocromo P450c17	90
Figura 35 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em estro com imunocoloração para citocromo P450c17	91
Figura 36 - Fotomicrografia da adrenal de <i>Galea spixii</i> utilizada como tecido controle com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.....	92
Figura 37 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em metaestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase	93
Figura 38 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em diestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase	94
Figura 39 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em proestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase	95
Figura 40 - Fotomicrografia da vagina de <i>Galea spixii</i> em estro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Duração do ciclo estral em diferentes espécies de roedores	33
Tabela 2 - Tabela demonstrativa dos procedimentos utilizados nos testes de imunohistoquímica.....	56
Tabela 3 - Duração do ciclo estral em <i>Galea spixii</i> : média e desvio padrão.....	59
Tabela 4 - Data de coleta, peso, tamanho e fase do ciclo estral das fêmeas de <i>Galea spixii</i> utilizadas no experimento <i>post mortem</i>	64
Tabela 5 - Dados referentes ao comprimento e espessura das vaginas das fêmeas de <i>Galea spixii</i>	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 IMPORTÂNCIA DA CRIAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES EM CATIVEIRO ...	22
2.2 BIOLOGIA DOS <i>Galea spixii</i> (PREÁS SILVESTRES DO SEMIÁRIDO	23
2.3 ÓRGÃOS GENITAIS INTERNOS E EXTERNOS EM FÊMEAS DE MAMÍFEROS	24
2.3.1 Vagina em fêmeas de mamíferos.....	26
2.3.2 Vulva e clitóris em fêmeas de mamíferos	27
2.4 CICLO ESTRAL	28
2.4.1 Fases do ciclo estral	29
2.4.2 Proestro	29
2.4.3 Estro.....	30
2.4.4 Metaestro	30
2.4.5 Diestro.....	31
2.4.6 Anestro.....	31
2.4.7 Duração do ciclo estral em diferentes espécies de mamíferos	32
2.5 CITOLOGIA ESFOLIATIVA PARA ESTUDO DO CICLO ESTRAL	33
2.6 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS	36
2.7 ENZIMAS CITOCROMO P450	38
2.7.1 Citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase)	40
2.7.2 Citocromo P450 aromatase.....	42
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVOS GERAIS	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 ANIMAIS	49
4.1.1 Procedência e acondicionamento	49
4.1.2 Eutanásia	51
4.2 LABORATÓRIOS	52

4.3 CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL	52
4.4 DISSECAÇÃO E ANÁLISE MACROSCÓPICA	54
4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA	54
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	55
4.7 TESTE IMUNOHISTOQUÍMICO PARA CITOCROMO P450, NADPH- CITOCROMO P450 REDUTASE E CITOCROMO P450C17.....	55
5 RESULTADOS	59
5.1 CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL (<i>in vivo</i>).....	59
5.2 MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS DA GENITÁLIA EXTERNA (<i>in vivo</i>).....	62
5.3 DATAS DE COLETA, MEDIDAS DOS ANIMAIS E FASES DO CICLO ESTRAL DAS COLETAS	63
5.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA E MORFOMÉTRICA DA VAGINA	64
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VAGINA E ÓRGÃOS GENITAIS EXTERNOS	65
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	73
5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	75
5.7.1 Citocromo P450 aromatase.....	76
5.7.2 Citocromo P450c17	84
5.7.3 NADPH citocromo P450 redutase.....	91
6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS	111

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

Desde que Stockard e Papanicolaou (1919), Selle (1922) e Kelly e Papanicolaou (1927) pesquisaram detalhadamente as mudanças epiteliais da vagina e o mecanismo de formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal em cobaias (*Cavia porcelus*), poucos estudos têm sido realizados com o intuito de fornecer maiores detalhes a respeito desse fenômeno de formação da membrana de oclusão vaginal nas espécies em que ela existe.

Sendo que esses poucos estudos estão baseados em métodos de caracterização do ciclo estral (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997) e os hormônios esteroides sexuais envolvidos nas mudanças epiteliais da vagina e na abertura dessa membrana (DEANESLY, 1966).

É amplamente conhecido que para a síntese de hormônios esteroides sexuais a partir de moléculas de colesterol são necessárias algumas enzimas esteroidogênicas (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; GAUCHER et al., 2004; SHET et al., 2007; CONLEY; FORD, 2009; CONLEY; CORBIN; HUGHES, 2009; PRAPORSKI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2010).

Porém, poucos estudos descrevem a presença de enzimas esteroidogênicas no tecido vaginal, como os de Lephart et al. (1989) nos *Rattus norvegicus*, e Berman et al. (2003) em humanos, sendo que, a maioria dos estudos em fêmeas aborda apenas a presença dessas enzimas em outros tecidos como no endométrio em casos de endometriose (DASSEN et al., 2007), câncer de mama, útero, osteoporose e amenorréia crônica em mulheres obesas (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993). Além de tumores de fígado, córtex adrenal (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001), hiperplasia adrenal congênita (COSTENARO et al., 2010), síndrome de ovário policísticos (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001) e os efeitos da menopausa na vagina em mulheres (BERMAN et al., 2003; WITHERBY et al., 2011).

As fêmeas de diversos roedores, como *Rattus norvegicus* (LEPHART et al., 1989), *Octodon degus* (MAHONEY et al., 2011), *Cavia porcellus* (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; SELLE, 1922), *Cavia aperea* e *Galea musteloides* (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001), apresentam domínio sobre o macho na cópula. Uma característica anatômica durante o processo reprodutivo destas espécies de roedores é a presença de uma membrana de oclusão vaginal, a qual se desenvolve segundo as variações hormonais decorrentes das fases do ciclo estral. Além disso, essas fêmeas se caracterizam por terem um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra externamente a vulva, o que favorece

a formação da membrana de oclusão vaginal (SELLE, 1922; DEANESLY, 1966; ADRIAN; SACHSER, 2011; MAHONEY et al., 2011).

Para tanto, o presente estudo se utiliza de fêmeas de *Galea spixii*, conhecidos popularmente como preás silvestres do semiárido, os quais são roedores pertencentes a família Caviidae e subfamília Caviinae (ADRIAN; SACHSER, 2011) que vivem na vegetação da Caatinga do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2008). Estes animais vêm sendo criados em cativeiro, objetivando sua utilização como fonte alternativa de alimento, além da preservação da espécie e utilização como modelos experimentais no desenvolvimento de pesquisas (ZOGNO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008, 2011; OLIVEIRA et al., 2008, 2010, 2012). Dentre as pesquisas em espécies de roedores da subfamília Caviinae, se destacam aquelas relacionadas aos aspectos morfológicos e fisiológicos do aparelho reprodutor (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997; MAHONEY et al., 2011) e os mecanismos placentários (OLIVEIRA et al., 2008; 2012).

Devido a carência de estudos envolvendo enzimas esteroidogênicas na vagina, o objetivo deste estudo é imunolocalizar no tecido vaginal, as enzimas citocromo P450c17 e a NADPH-citocromo P450 redutase responsáveis pela síntese de andrógenos a partir da progesterona e a enzima citocromo P450 aromatase em conjunto com a NADPH-citocromo P450 redutase, as quais fazem a catalise metabólica dos estrógenos a partir dos andrógenos nos mamíferos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; GAUCHER et al., 2004; CONLEY; CORBIN; HUGHES, 2009; PRAPORSKI et al., 2009).

Portanto espera-se com este estudo mostrar pela primeira vez, a relação das enzimas esteroidogênicas com as mudanças epiteliais na vagina desses roedores durante o ciclo estral e associar com o fenômeno de formação da membrana de oclusão vaginal, uma vez que o conhecimento detalhado dos aspectos reprodutivos de uma espécie está diretamente relacionado a programas de preservação e criação em cativeiro nesta espécie.

REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura aborda a importância da criação de animais silvestres em cativeiro, a biologia dos animais aqui estudados, os órgãos reprodutores femininos de mamíferos em geral e relativos aos roedores da família caviidae, características do ciclo estral dos mamíferos em geral e de roedores da família caviinae, método de detecção do ciclo estral utilizando citologia esfoliativa vaginal e as imunomarcações das enzimas citocromo P450c17, P450 aromatase e NADPH citocromo P450 redutase.

2.1 IMPORTÂNCIA DA CRIAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES EM CATIVEIRO

A utilização de fontes renováveis de alimentação desempenha importante papel no sustento de populações em crescimento contínuo, e de grandes desigualdades sociais, principalmente em regiões do mundo onde os recursos alimentares são limitados, sendo que estas fontes alternativas geralmente são animais da fauna silvestre (CARVALHO et al., 2003; ZOGNO et al., 2004; ADDO et al., 2007).

No entanto, devido a grande demanda e comercialização da carne, muitas espécies têm sido agressivamente extraídas do ambiente natural sem nenhuma preocupação com sua conservação e nem com os efeitos sobre o equilíbrio ambiental (GUIMARÃES et al., 2008).

No Brasil, a maior parte da comercialização de produtos de origem da fauna silvestre, como a carne, couro, ovos, óleos, peles e plumas são realizados ilegalmente, sendo que os principais roedores silvestres procurados para consumo humano no Brasil são: a paca, a cutia, as capivaras (GUIMARÃES et al., 2008), os mocós e os preás (OLIVEIRA et al., 2010).

Além da alimentação, diversas espécies desses roedores, servem como modelo biológico para descoberta de terapias e estratégias de prevenção de diversas doenças em humanos (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2007; MENDONÇA et al., 2007).

Torna-se então, imprescindível a conservação destes animais pertencentes a fauna silvestre não apenas para reposição em seus habitats como também pelo grande interesse comercial da carne (ZOGNO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008)

Portanto, torna-se necessário, estudos pormenorizados a respeito dos aspectos reprodutivos destes animais, como a monitoração hormonal para determinar o ciclo estral, o início da puberdade, a duração da receptividade sexual, os efeitos sazonais, o diagnóstico de prenhes, o momento do parto, a espermatogênese e a saúde física (SILVA et al., 2006;

GUIMARÃES et al., 2011), além do tamanho dos testículos, qualidade do sêmen e espermatozóide, mortalidade do embrião e feto e mortalidade perinatal (ADDO et al., 2007), para que enfim ocorra a reprodução destes no ambiente e em cativeiro (ZOGNO et al., 2004; SILVA et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008).

Além disso, entender como os animais se reproduzem pode contribuir para providenciar biotecnologias de reprodução, incluindo inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embrião e criopreservação nas diversas espécies criadas em cativeiro (GUIMARÃES et al., 2011), garantindo um melhor desempenho reprodutivo e preservação da variabilidade genética (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2007).

2.2 BIOLOGIA DOS *Galea spixii* (PREÁS SILVESTRES DO SEMIÁRIDO)

O *Galea spixii*, cujo nome popular é preá silvestre do semiárido é uma espécie de roedor da família Caviidae e subfamília Caviinae (ADRIAN; SACHSER, 2011) que vive na vegetação da Caatinga do Nordeste brasileiro. Estes animais vêm sendo criados em cativeiro, objetivando sua utilização como fonte alternativa de alimento, além da preservação da espécie e utilização como modelo biológico em pesquisas (CARVALHO et al., 2003; ZOGNO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008, 2011; OLIVEIRA et al., 2008, 2010).

Os animais dessa espécie (machos e fêmeas) possuem tamanhos variando entre 22,5- 23,5 cm de comprimento e seu peso varia entre 375- 405 gramas, sendo, portanto, muito menor que o Guinéa pig doméstico (OLIVEIRA et al., 2008) e roedores da família Dasyproctidae, e maiores que os roedores da família Muridae (PERCEQUILLO et al., 2007).

Possuem o corpo alongado, coloração uniforme, com a superfície dorsal cinza-escura amarelada e ventre branco (OLIVEIRA et al., 2010).

Suas mãos possuem três dedos e seus pés possuem quatro dedos. Sua pelagem é rala e áspera apresentando um anel de coloração mais clara ao redor dos olhos, além disso, observa-se ausência de uma cauda. Apresentam crânio com forâmen infraorbitário grande, possuem dentes incisivos largos com a face anterior amarela; um pré-molar e três molares com característica prismática e laminar (PERCEQUILLO et al., 2007) (Figura 1).

São animais de hábito crepuscular, vivem em bandos e alimenta-se de folhas, ramos e frutos de plantas rasteiras, raízes tubérculos e casca de árvores (OLIVEIRA et al., 2010).

As fêmeas dos preás silvestres do semiárido possuem comportamento reprodutivo do tipo poliestrual contínuo e, portanto se reproduzem durante todo o ano, mesmo na estação de

verão seco e na ausência de abundância de alimento relativos à estação do ano, conseguindo inclusive manter a gestação mesmo desprovida de condições nutricionais ideais (OLIVEIRA et al., 2008; 2012).

Figura 1 - Fotografia de uma fêmea adulta de *Galea spixii* criada em cativeiro. Fonte: (SANTOS, 2012).

Para se reproduzir, as fêmeas constroem ninhos entre as pedras e a vegetação e podem gerar entre dois e quatro filhotes. Apresentam um período gestacional máximo de 48 dias (OLIVEIRA et al., 2008).

Referentes a outros aspectos reprodutivos, foram descritos as características da placenta e saco vitelino (OLIVEIRA et al., 2008; 2012), espermatogênese (SANTOS et al., 2012) e um estudo comportamental que revelou alto grau de agressividade nas fêmeas ao se aproximar o estro (ADRIAN; SACHSER, 2011). Todavia, verifica-se que, na literatura, ainda há necessidade de dados referentes à anatomia e fisiologia reprodutiva principalmente em fêmeas (OLIVEIRA et al., 2010).

2.3 ÓRGÃOS GENITAIS INTERNOS E EXTERNOS EM FÊMEAS DE MAMÍFEROS

O aparelho genital feminino dos mamíferos quadrúpedes pode ser dividido em órgãos internos (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005) que são constituídos pelos ovários que são gônadas pares que produzem os gametas femininos e hormônios esteroides sexuais (WHITWORTH et al., 1999; GLICKMAN et al., 2006) a tuba uterina, que captam os óvulos libertados pelos ovários e os transportam para o útero; o útero, constituído por três partes distintas: a cérvix, o corpo e os cornos uterinos, onde os óvulos fertilizados ficam retidos e são nutridos até que o desenvolvimento pré-natal esteja completo; a vagina, dividida em vagina propriamente dita e vestibulo da vagina (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007; DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Enquanto os órgãos genitais externos compreendem a vulva e o clitóris (SCHALLER, 1999; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Em contrapartida, nos mamíferos bípedes como o macaco *Saimiri sciureus* (BRANCO et al., 2010) e humanos, a genitália externa é constituída pelas partes visíveis do trato genital feminino, ou seja, é formado pelo vestibulo da vagina, vulva e clitóris (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

No entanto, existem fêmeas de mamíferos que possuem órgãos genitais altamente masculinizados como as hienas manchadas *Crocuta crocuta* (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; CARMONA et al., 2008), as quais são caracterizadas pela ausência de uma abertura vaginal externa, sendo que os lábios vulvares maiores são fusionados, formando um pseudo-escroto. Além disso, as fêmeas dessa espécie apresentam um clitóris hipertrófico (clitóris peniano) o qual é transpassado por um seio urogenital central, por onde ocorre a excreção de urina, a cópula com o macho e o nascimento do filhote (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006; CARMONA et al., 2008).

Os outros órgãos genitais das hienas manchadas (tuba uterina e útero) seguem a configuração de outras fêmeas de mamíferos (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006).

Microscopicamente, os ovários dessas fêmeas, apresentam abundância de tecido intersticial e baixo número de folículos ovarianos (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006).

As fêmeas de lêmures *Eulemur flavus rufus* também apresentam um clitóris peniano, enquanto os outros órgãos segue o padrão de outros mamíferos, sobretudo primatas (OSTNER; HEISTERMANN; KAPPELER, 2003).

Fêmeas de toupeiras *Talpa europea* também apresentam clitóris peniano, porém não transpassado pela uretra, semelhante ao pênis do macho dessa espécie. Além disso, essas

fêmeas apresentam um bilateral ovo-testículo composto por uma região ovariana normal que predomina na estação de acasalamento e uma região testicular (glândula intersticial) que predomina no outono, fora da estação de acasalamento. Os outros órgãos genitais seguem as características normais de outras espécies de mamíferos (WHITWORTH et al., 1999; RUBENSTEIN et al., 2003; CARMONA et al., 2008).

Diversos roedores, como os *Rattus norvegicus* (LEPHART et al., 1989), *Cavia porcellus* (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; SELLE, 1922; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997), *Cavia aperea* e *Galea musteloides* (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001), os *Thryonomys swinderianus* (ADDU et al., 2007) encontrados na África, os *Lagostomus maximus* (WEIR, 1971) e *Octodon degus* (MAHONEY et al., 2011) as fêmeas se caracterizam por terem domínio do macho sobre a cópula por apresentarem uma membrana de oclusão vaginal e um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra (SELLE, 1922, DEANESLY, 1966; MAHONEY et al., 2011). Esta característica nesses roedores está intimamente relacionada com a seleção sexual intraespecífica e variações do ambiente (PURVES et al., 2005; ADRIAN; SACHSER, 2011).

2.3.1 Vagina em fêmeas de mamíferos

Nos mamíferos domésticos e também nos *Saimiri sciureus*, a vagina é uma estrutura anatômica que apresenta a forma tubular, intermediando a comunicação entre vulva, cérvix e útero, constituindo-se no órgão copulador feminino (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007; BRANCO et al., 2010).

Sua estrutura, basicamente é a de um tubo muscular formando uma cavidade virtual que conecta o útero ao vestíbulo, em que espécies que o possuem (SAMUELSON, 2007) ou o útero a vulva quando é inexistente um vestíbulo como na espécie de roedores *Lagostomus maximus* (WEIR, 1971), *Cuniculus paca* (REIS et al., 2011), *Myocastor coypus* (FELIPE; CASTRO; CALLEJAS, 2000) e *Hydrochoerus hidrocaeris* (POCOCK, 1922).

Histologicamente, a vagina apresenta as camadas: mucosa e submucosa que formam pregas, camada muscular e adventícia nas fêmeas de mamíferos domésticos (GEORGE; RODRIGUES; LESQUEVES, 1998; SAMUELSON, 2007).

O epitélio de revestimento interno da mucosa da vagina é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado nos *Cavia porcellus* (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919) e na maioria dos mamíferos domésticos, sendo também rico em glicogênio (GEORGE;

RODRIGUES; LESQUEVES, 1998; SAMUELSON, 2007), desprovido de glândulas, e este epitélio sofre variações por influência hormonal (DEANESLY, 1966; BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

Na maioria das espécies, a camada mucosa e submucosa, forma dobras ou pontes que se estendem ao longo do eixo longitudinal destas estruturas (SAMUELSON, 2007).

O tecido conjuntivo subjacente da lâmina própria submucosa é frouxo ou denso e possui nódulos linfóides dispersos. A camada muscular é composta por duas ou três subcamadas: uma longitudinal interna, uma longitudinal externa e uma circular média (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

A camada serosa está presente cranialmente, continuando caudalmente como camada adventícia (BANKS, 1991). No espaço subseroso podem ser encontradas algumas fibras musculares lisas (muscular da serosa) (SAMUELSON, 2007) em continuidade com o músculo liso do ligamento largo (BANKS, 1991).

Cranialmente, a túnica muscular da vagina é externamente interrompida, pela perda de tecido conjuntivo da camada adventícia que dá lugar a elementos vasculares e nervosos que nutrem a vagina (SAMUELSON, 2007).

2.3.2 Vulva e clitóris em fêmeas de mamíferos

A vulva é a estrutura mais externa e caudal do trato genital feminino e é formada pelo vestibulo (em algumas espécies onde não compõe a genitália externa) (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005) e os lábios que são pregas da pele compostas por estruturas tegumentares típicas e o clitóris (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007). A vulva é responsável pela separação dos meios externo e interno, sendo formada pelos lábios vulvares, delimitando a abertura e constituindo a rima vulvar (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007).

Sua posição é vertical em relação ao corpo do animal: a porção dorsal é arredondada e a ventral aguda, com a presença de pelos. Na cadela, a vulva torna-se bastante edemaciada pela ação dos estrógenos, ao iniciar-se o proestro, atingindo o aumento máximo durante o estro; tal fato é menos evidente na égua e na vaca; nas gatas, a vulva não demonstra respostas evidentes a ação dos estrógenos, durante o proestro e o estro (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Na comissura ventral da vulva interna encontra-se o clitóris, que é um órgão homólogo ao pênis masculino, porém sem apresentar a abertura da uretra nos mamíferos domésticos (SAMUELSON, 2007).

Em algumas espécies sua forma se assemelha a glândula do pênis masculino. Nos suínos, ruminantes e felinos o clitóris se localiza na fossa do clitóris, onde está aderida ao prepúcio pela glândula do clitóris (SCHALLER, 1999) (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Nas fêmeas de macacos de cheiro e primatas Cebídeos, o clitóris é hipertrófico, dificultando a sexagem (BRANCO et al., 2010)

O clitóris é constituído por um corpo, uma glândula e uma cobertura prepucial. O corpo do clitóris contém corpo cavernoso, tecido adiposo e músculo liso que está circundado por uma lâmina de tecido conjuntivo denso e elementos linfóides (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

A glândula clitoriana pode ter tecido cavernoso (cadela e égua) ou tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado. A cobertura prepucial é uma prega aglandular e glabra da membrana mucosa cutânea do vestibulo, a qual é rica em terminações nervosas sensitivas e é revestido por epitélio estratificado não queratinizado (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

O clitóris é uma estrutura erétil e em alguns animais como os bovinos, bubalinos e caninos (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005). E nas *Crocuta crocuta* (GLICKMAN et al., 2006).

Em algumas espécies de roedores a vulva é caracterizada pela presença de uma membrana de oclusão vaginal, acompanhada de um clitóris hipertrofiado, por onde passa a uretra que se abre no topo do clitóris. A membrana de oclusão vaginal se forma durante o ciclo estral e está ausente apenas no estro, quando esta se rompe (STOCKARD; PAPANICOLAOU; 1919; SELLE, 1922; DEANESLY, 1966; LEPHART et al., 1989; TOUMA; PALME; SACHSER, 2001; ADRIAN; SACHSER, 2011; MAHONEY et al., 2011; REIS et al., 2011).

2.4 CICLO ESTRAL

Os órgãos reprodutores femininos sofrem alterações cíclicas que se manifestam macro e microscopicamente e também comportamentalmente. Dessa maneira, as fêmeas alternam fases de atividade sexual com outras de gestação ou de repouso sexual. Estas variações

constituem o que se denomina ciclo estral (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007).

O ciclo estral caracteriza-se por modificações cíclicas que ocorrem nas fêmeas após a puberdade, sendo definido como ritmo funcional do aparelho reprodutor feminino, regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente aqueles referentes à secreção hormonal ovariana influenciada pela secreção e retroalimentação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (BANKS, 1991; BENETTI; TONIOLO; OLIVEIRA, 2004; SAMUELSON, 2007; MAHONEY et al., 2011).

O controle da atividade hipotalâmica nas fêmeas, está sujeito a influências reguladoras semelhantes as manifestadas nos machos, sendo os estímulos ópticos e olfatórios, os moduladores da atividade do eixo hipotalâmico-ovariano (BANKS, 1991).

2.4.1 Fases do ciclo estral

Os estágios ou fases do ciclo estral são de duração variável nas diferentes espécies de mamíferos domésticos. As cadelas são monoéstricas com o ciclo estral dividido em proestro, estro, metaestro, diestro e um longo período de anestro (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

As espécies poliédricas como as vacas, porcas (BANKS, 1991) e roedores como os *Galea spixii* (OLIVEIRA et al., 2008) possuem ciclo estral que termina num período de diestro que emerge como o proestro do ciclo estral seguinte.

Nos animais poliédricos estacionais como as éguas, vacas e ovelhas, o diestro terminal se continua como um período de anestro mais curto que o dos animais monoéstricos antes do próximo ciclo estral (BANKS, 1991).

2.4.2 Proestro

Durante o período de proestro, os ovários são influenciados pelo FSH e isto resulta no crescimento rápido dos folículos ovarianos e no início da atividade secretora de estrógenos (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

Nesta fase do ciclo estral, o hormônio sexual feminino 17-beta-estradiol começa a imprimir suas ações sobre o organismo animal, iniciando-se marcantes modificações no trato

genital feminino, assim como, alterações de comportamento e temperamento, que nessa fase ainda não são claramente perceptíveis, mas corresponderiam ao período preparatório para a cópula (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; ALLISON et al., 2008).

Os níveis sanguíneos de 17-beta-estradiol iniciam um gradativo aumento e os teores plasmáticos ou lácteos de progesterona pouco a pouco diminuem seus valores até alcançarem aqueles considerados como mínimos (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Nesta fase inicia-se a secreção de feromônios específicos com os quais a fêmea atrai o macho, porém ainda não aceita a cópula (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

2.4.3 Estro

Este período também é conhecido como cio, calor ou vício (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007) e é caracterizado pela tolerância a monta do macho, e possível cópula (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

O período coincide com a concentração máxima de 17-beta-estradiol no sangue circulante, enquanto que a progesterona atinge o nível basal (BANKS, 1991; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; GUIMARÃES et al., 2008; ALLISON et al., 2008).

A secreção de FSH começa a cair e no momento que antecede a oocitação ocorre súbita elevação do nível sanguíneo de LH (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002), seguido pela ruptura do folículo, caracterizando a oocitação (BANKS, 1991; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007; ALLISON et al., 2008).

O trato genital apresenta aumento da umidade vaginal e abundante acúmulo de secreção de muco que se associa a secreção das glândulas epiteliais do canal cervical (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; ALLISON et al., 2008).

No estro ocorre a oocitação nas ovelhas, éguas, porcas, cadela e gatas (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

A oocitação pode ser considerada um período de transição entre o estro e o metaestro, ou parte do estágio de metaestro (BANKS, 1991).

2.4.4 Metaestro

O metaestro, também conhecido como pós-estro é o período que se inicia imediatamente ao final do estro. Este é o período em que ocorre a oocitação nas vacas, búfalas e cabras (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Após a oocitação, forma-se no ovário o corpo hemorrágico, que se transforma em corpo lúteo e dá início a maior produção de progesterona nesta fase (BANKS, 1991; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; SAMUELSON, 2007).

Nas cadelas, esse período não pode ser considerado isoladamente do ponto de vista clínico, sendo associado e avaliado juntamente com o diestro (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007; ALLISON et al., 2008).

Todavia existem pesquisadores que se opõe a isso, sugerindo ser melhor a abolição da divisão e da denominação diestro, reunindo todas suas manifestações no metaestro (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

2.4.5 Diestro

O diestro também é conhecido por interestro, caracterizando-se como a fase em que o corpo lúteo atinge a plenitude de secreção de progesterona (BANKS, 1991; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SILVA et al., 2006).

Se não ocorre a prenhes, a vascularização do trato genital diminui; a atividade secretora é interrompida e as células de revestimento e glândulas involuem. O final do diestro se caracteriza pela involução do corpo lúteo e pela sua degeneração, formando o corpo albicans. Entretanto se a prenhes ocorrer, o corpo lúteo continua sua atividade secretora máxima de progesterona (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007).

2.4.6 Anestro

O anestro representa a fase do ciclo reprodutivo das fêmeas, no qual não existe manifestação de cio ou estro e é um período evidentemente maior do que o formado pela meta e diestro juntos (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Em condições fisiológicas, o anestro representa um período de repouso ou quiescência temporária do trato genital feminino (SAMUELSON, 2007), ocorrendo nas espécies animais

poliétricas sazonais, que somente ciclam durante um determinado período do ano (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Neste período, o corpo lúteo continua a sua involução e o desenvolvimento folicular se interrompe (BANKS, 1991).

A situação também é observada durante a gestação, quando a fêmea permanece no período gestacional, na maioria das vezes sem apresentar nenhum sintoma típico de cio (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; SAMUELSON, 2007).

Em algumas espécies animais, ocorre um longo anestro no período pós-parto, quando há necessidade de repouso sexual para uma perfeita involução uterina, que representa o período de transição entre o parto e o primeiro estro. O anestro em condições patológicas caracteriza-se como um longo período de aciclia ou ausência de ciclos estrais (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

2.4.7 Duração do ciclo estral em diferentes espécies de mamíferos

Entre as fêmeas de mamíferos, existem ciclos curto e longos, assim como ciclos não detectáveis ou anovulatórios (VALE; RIBEIRO, 2005).

Dessa maneira, podem ocorrer, a oocitação, formação do corpo lúteo e receptividade da fêmea para a cópula de maneira espontânea ou através de estímulos externos (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001; MAHONEY et al., 2011).

Durante o estro a oocitação pode ocorrer de forma espontânea como a encontrada na maioria dos mamíferos (Ex: *Cavia porcellus*, *Cavia aperea*, *Galea musteloides*, camundongos, cães e a maioria dos primatas), ou pode ocorrer através de estímulos da cópula (Ex: toupeiras e gatos) (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001).

As características celulares do epitélio vaginal em cada fase do ciclo estral, assim como o a duração de cada ciclo estral varia nas diferentes espécies de mamíferos (BANKS, 1991), principalmente entre os roedores histricomorfos (FELIPE; CASTRO; CALLEJAS, 2000; FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), conforme demonstrado na tabela 1.

As variações na duração do ciclo estral podem ainda, ser decorrente de manejo, alimentação, clima e genética (VALE; RIBEIRO, 2005).

Tabela 1- Duração do ciclo estral em diferentes espécies de roedores.

	Espécie	Autor	duração (dias)
subfamília	<i>Cavia porcelus</i>	Lilley; Epping; Hafner, 1997	15-17
Caviinae	<i>Cavia aperea</i>	Touma; Palme; Sachser, 2001	15
	<i>Microcavia australis</i>	Adrian e Sachner, 2011	15
	<i>Dasyprocta prymnolopha</i>	Guimarães et al., 2011	25-40
Outras	<i>Dasyprocta prymnolopha</i>	Guimarães; Moreira; Vale, 1997	19-40
famílias e	<i>Agouti paca</i>	Guimarães et al., 2008	24-42
subfamílias	<i>Octodon degus</i>	Mahoney et al., 2011	17-22
de	<i>Myocastor coypus</i>	Felipe; Cabodevila; Callejas, 2001	20-60
roedores	<i>Thryonomys swinderianus</i>	Addo et al., 2007	27.8 ± 22.1
	Ratos Wistar	Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002	4-5
	<i>Mus musculus</i>	Mendonça et al., 2007	4

2.5 CITOLOGIA ESFOLIATIVA PARA ESTUDO DO CICLO ESTRAL

O método indireto e menos invasivo para o estudo do ciclo estral em animais mamíferos é a citologia esfoliativa vaginal (PORTO et al., 2007). Além disso, esse é um método de monitoração de baixo custo (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Além de ser um método confiável igualmente a outros métodos de monitoração do ciclo estral (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997).

Neste método a citologia vaginal é estudada através da calpocitologia ou citologia esfoliativa, introduzido por Papanicolaou em 1942. Esta técnica envolve o estudo de células naturalmente descamadas ou daquelas retiradas artificialmente da superfície dos tecidos e possibilita o diagnóstico citológico da vagina, uma vez que este sofre modificações em função de variações hormonais cíclicas durante o ciclo estral, como também é utilizado no diagnóstico precoce de patologias do trato genital feminino (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2007; PORTO et al., 2007; ALLISON et al., 2008; SNOECK et al., 2011).

O epitélio da mucosa vaginal apresenta várias camadas morfológicamente distintas que variam em espessura ao longo do ciclo estral.

Os estrogênios têm ação mitogênica e pró-proliferativa no epitélio vaginal, estimulando o espessamento e queratinização parcial das células mais superficiais do epitélio,

que se destacam para o lúmen do órgão na fase proliferativa e isto causa acúmulo de glicogênio (BANKS, 1991; ALLISON et al., 2008).

Por outro lado, a progesterona provoca diminuição da espessura do epitélio vaginal, promovendo a descamação das camadas superficiais (DEANESLY, 1966; SAMUELSON, 2007).

O epitélio pavimentoso estratificado da vagina da cutia e outros mamíferos se dividem nas camadas: germinativa, basal, intermediária e superficial (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997).

Na fase luteínica, o epitélio de revestimento vaginal apresenta-se com poucas camadas celulares, entretanto há intensa proliferação na fase estrogênica quando o epitélio pode apresentar até 30 camadas. (PORTO et al., 2007). As camadas celulares do epitélio vaginal estratificam-se na seguinte ordem: células basais, células parabasais, células intermediárias, células superficiais nucleadas e anucleadas queratinizadas (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Nas viscacha (WEIR, 1971) e *Cavia porcellus* (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; DEANESLY, 1966), o epitélio vaginal passa de delgado com poucas camadas no período pré-púbere, para intensamente estratificado no proestro e estro.

Durante o diestro e metaestro ocorre diminuição no número de células superficiais e aumento de células intermediárias pequenas e grandes e células parabasais, com os neutrófilos voltando a aparecer e aumentando progressivamente. Estas características celulares são relatadas nas cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), nas fêmeas de coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), nas raposas (MONTEIRO et al., 2002), nas leões africanas (SILVA et al., 2006), nas ovelhas da raça Santa Inês (PORTO et al., 2007), nas espécies de mamíferos domésticos (SAMUELSON, 2007), nas cadelas (ALLISON et al., 2008), nas pacas (GUIMARÃES et al., 2008) e nas preguiças-de-coleira (SNOECK et al., 2011).

Em espécies que apresentam anestro, o predomínio é de células parabasais e intermediárias, com baixo número de neutrófilos (SAMUELSON, 2007; ALLISON et al., 2008).

Sendo assim, a caracterização das células esfoliativas vaginais de cada fase do ciclo estral nos mamíferos pode ser realizada, utilizando a proporção média dos tipos de células de cada esfregaço (MARCONDES et al., 2002).

Nos roedores histricomorfos como o *Cavia porcellus* e *Cavia aperea aperea* (Guinea pigs ou preás) (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), nos ratos e no *Myocastor coypus*

(FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), assim como nos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002), na *Hydrochoerus hydrochoeris* (capivara) (BARBOSA et al., 2007), camundongos *Mus musculus* (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2007), *Aguti paca* (paca) (GUIMARÃES et al., 2008), e *Dasyprocta prymnolopha* (cutia), o ciclo sexual é bem caracterizado através dos esfregaços vaginais (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997).

As raposas (*Cerdocyon thous*) (MONTEIRO et al., 2002), as leoas africanas (*Panthera Leo*) (SILVA et al., 2006) e as preguiças de coleira (SNOECK et al., 2011), a exemplo dos roedores histricomorfos, também apresentam ótima padronização celular no exame de citologia esfoliativa vaginal, com as fases do ciclo estral bem definidas e por esta maneira este tipo de exame pode ser bem utilizado para determinar o ciclo estral nessas espécies.

Nos eqüinos, o estudo do ciclo estral através da citologia esfoliativa vaginal tem se tornado uma ferramenta importante, devido a utilização de técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões (ROMANO; MUCIOLO; SILVA, 1998).

As células do epitélio vaginal nas diversas espécies de mamíferos podem ser divididas em:

- Células basais, que são células pequenas e ovóides, com núcleo grande em relação ao citoplasma que são raramente encontradas em esfregaços vaginais de ovelhas Santa Inês (PORTO et al., 2007) e cães e gatos (ALLISON et al., 2008).

- Células parabasais, que são pequenas e arredondadas e possuem núcleo central, arredondado e vesiculado predominante sobre o citoplasma nas cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), nas cabras das raças Saanen, Alpina, Anglonubiana e sem raça definida (YAMADA; KOZICKI, 1998), nos coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), nas capivaras (BARBOSA et al., 2007), nas ovelhas Santa Inês (PORTO et al., 2007) e nos cães e gatos (ALLISON et al., 2008) e nas preguiças-de-coleira (*Bradypus torquatus*) (SNOECK et al., 2011). Nos coypus e nas capivaras, este tipo celular aparece isolado ou em pequenos grupos (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001; BARBOSA et al., 2007).

- Células intermediárias, que variam em tamanho dependendo da quantidade de citoplasma. As células intermediárias pequenas têm formato ovóide irregular com núcleo menor que o das células parabasais e maior quantidade de citoplasma em relação ao núcleo nas cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), nos coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), nas capivaras (BARBOSA et al., 2007), nas ovelhas santa Inês (PORTO et al., 2007), nos cães e gatos (ALLISON et al., 2008) e nas preguiças de coleira (SNOECK et al., 2011); enquanto as células intermediárias grandes destas espécies possuem núcleo

pequeno em relação ao citoplasma e têm formato poligonal parecido ao das células superficiais. A diferença na relação núcleo citoplasma, com diminuição do núcleo nas células intermediárias das capivaras (BARBOSA et al., 2007) e dos cães e gatos (ALLISON et al., 2008), é característico de apoptose.

- As células superficiais das cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), dos coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), das capivaras (BARBOSA et al., 2007), das ovelhas Santa Inês (PORTO et al., 2007), dos cães e gatos (ALLISON et al., 2008) e da preguiça de coleira (SNOECK et al., 2011) também são chamadas de células cornificadas ou escamosas e podem ser divididas em: células com núcleo picnótico e células anucleadas. Ambos os tipos de células superficiais destas espécies são maiores que as células intermediárias e possuem aparência poligonal, se apresentando quase sempre com as bordas dobradas e com queratina incorporada em seu citoplasma claro e homogêneo.

Em exames através de citologia esfoliativa nas cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), nos coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), nas ovelhas Santa Inês (PORTO et al., 2007) e nas pacas (*Aguti paca*) (GUIMARÃES et al., 2008) aparecem todos os tipos celulares do epitélio vaginal (superficial, intermediária, parabasal e basal), porém em frequências diferentes, variando de acordo com as fases do ciclo estral proestro, estro, metaestro e diestro.

No estro das cutias (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997), das fêmeas de coypus (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), das raposas (MONTEIRO et al., 2002), das leas africanas (SILVA et al., 2006), das ovelhas da raça Santa Inês (PORTO et al., 2007), das cadelas (ALLISON et al., 2008), das pacas fêmeas (GUIMARÃES et al., 2008) e das preguiças-de-coleira (SNOECK et al., 2011), o predomínio encontrado nos esfregaços é de células superficiais e normalmente há ausência de neutrófilos.

2.6 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS

Os hormônios esteroides sexuais são essenciais para o controle endócrino da reprodução nos vertebrados, sendo que muitas doenças e condições que afetam a fertilidade e a saúde em geral são acompanhadas de alterações no metabolismo de andrógenos e estrógenos, sendo que muitas vezes são anormalidades genéticas que afetam as enzimas esteroidogênicas e os receptores de hormônios esteroides sexuais (PRAPORSKI et al., 2009; NAKAMURA, 2010).

O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormônios esteroides: os progestágenos, os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os andrógenos e os estrógenos (STRYER, 1996; MILLER, 2009).

Na síntese dos hormônios esteroides sexuais, o colesterol é primeiro convertido em pregnenolona e depois progestágenos, que é então transformada em andrógenos (androstenediona e testosterona), e estes, são convertidos em estrógenos (GAUCHER et al., 2004; MILLER et al., 2009; NAKAMURA, 2010).

A progesterona é um progestágeno que entre outras funções, prepara o revestimento interno do útero para a implantação de um ovo, além de ser essencial para a manutenção da gestação (STRYER, 1996).

Os androgênios (tal como a testosterona) são importantes na diferenciação sexual, sendo responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas (MILLER, 2009; NAKAMURA, 2010; KNAPCZYK-STWORA et al., 2011).

Os estrogênios são necessários para o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários femininos, além de se aliar a progesterona para participa do ciclo ovariano (NAKAMURA, 2010).

Para a catálise metabólica dos hormônios esteroides sexuais são requeridos complexos enzimáticos conhecidos como citocromo P450c17 para fazer a catalise da pregnenolona a progestágenos e de progestágenos a produzir andrógenos, além da enzima citocromo P450aromatase para catalisar andrógenos a estrógenos (GAUCHER et al., 2004), sendo que, estas duas enzimas necessitam estarem acopladas a enzima NADPH citocromo P450 redutase para realizarem a atividade enzimática (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; NAKAMURA, 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema demonstrativo das vias de síntese de hormônios esteroides sexuais.

Legenda: Notar que todos os hormônios derivam do colesterol; observar as enzimas (sublinhado e itálico) que realizam a metabolização dos hormônios (GAUCHER et al., 2004; CONLEY; CORBIN; HUGHES, 2009; PRAPORKI et al., 2009; NAKAMURA, 2010). Fonte: (SANTOS, 2012)

2.7 ENZIMAS CITOCROMO P450

As enzimas são as responsáveis por reações de biotransformação e encontram-se presentes em todo o organismo, concentrando-se principalmente no fígado (WATKINS, 1992; NORMAN; LITWICK, 1997).

Testes bioquímicos realizados com o tecido hepático por centrifugações sucessivas permitiram constatar a presença de enzimas nas diferentes frações denominadas solúvel

(desidrogenases, esterases, amidases e transferases), mitocondrial (monoamino oxidases) e microssomal (citocromos P450) (WATKINS, 1992; STRYER, 1996; NORMAN, LITWICK, 1997).

A fração hepática microssômica corresponde aos fragmentos dos retículos endoplasmáticos centrifugados por 60 minutos a 150 mil giros por minuto. As enzimas localizam-se predominantemente na superfície do retículo endoplasmático liso e constituem o sistema oxidase de função mista ou monoxigenases ou sistema citocromo P450 (FRANCO; FRANCO, 2003).

As hemoproteínas citocromo P450 compreendem uma superfamília de genes com mais de 300 membros conhecidos, pertencentes a 36 famílias de genes (GRAHAN-LORENCE et al., 1995).

Os componentes do sistema P450 são componentes primordiais do sistema enzimático oxidativo (STRYER, 1996; FRANCO; FRANCO, 2003; MILLER, 2009; KNAPCZYK-STWORA et al., 2011).

Este sistema foi assim denominado porque o complexo formado com o monóxido de carbono apresentava um pico de absorção espectrofotométrica no comprimento de onda 450 nm. Essa enzima apresenta um núcleo pirrólico com o átomo de ferro à semelhança da hemoglobina, sendo considerada uma hemoproteína (GRAHAN-LORENCE et al., 1995; FRANCO; FRANCO, 2003; MILLER, 2009).

As enzimas P450 em mamíferos são codificadas por 10 famílias de genes e seus nomes começam com CYP do inglês cytochrome P450. Os seres humanos possuem mais de 100 genes que codificam as enzimas P450 com especificidades distintas (STRYER, 1996).

A terminologia usada para denominar as várias isoformas tem a ver com a similaridade estrutural na composição aminoacídica. A nomenclatura que define os vários elementos das famílias não reflete qualquer aspecto funcional. Como exemplo refere-se que em CYP3A4, CYP diz respeito a citocromo P450, 3 à família genética, A à sub-família genética e 4 ao gene específico. Qualquer pequena alteração na sequência de aminoácidos pode ser de consequências incalculáveis para o metabolismo. A transmissão de alterações é habitualmente autossômica recessiva (SANTIAGO, 2003).

As moléculas sobre a qual essas enzimas atuam podem ser de origem endógena como ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, bem como compostos exógenos como drogas, pesticidas, aditivos de alimentos e outros compostos químicos que são inalados, ingeridos ou absorvidos pela camada epidérmica da pele (NORMAN; LITWICK, 1997).

A função do sistema citocromo P450, é a hidroxilação em vez de fosforilação oxidativa. O NADPH transfere seus elétrons de alto potencial para a flavoproteína desta cadeia que são então levados para a adrenodoxina que é uma ferropoteína não hemínica (GRAHAN-LORENCE et al., 1995; STRYER, 1996).

A adrenodoxina transfere um elétron para reduzir a forma férrica do P450 a forma ferrosa. A ligação de O₂ ao hemo é seguida do recebimento de um segundo elétron vindo da adrenodoxina. Nesse momento, o átomo de ferro está no estado 3+ e o oxigênio ligado está no estado -2. Um dos átomos de oxigênio ligados é então reduzido a água. Um átomo do hidrogênio é retirado do substrato RH para formar R-. Esse radical livre transitório adquirem o outro oxigênio ligado para formar ROH, o outro produto hidroxilado (STRYER, 1996; FRANCO; FRANCO, 2003; SANTIAGO, 2003).

A introdução de hidroxilas proporciona pontos para conjugação com unidades altamente polares que notadamente aumentam a solubilidade da molécula aromática modificada. Entretanto a ação do sistema P450 não é sempre benéfica, pois alguns dos mais poderosos carcinógenos são convertidos in vivo a uma forma quimicamente reativa e essa ativação metabólica é geralmente feita pelo sistema P450 (STRYER, 1996; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

As enzimas citocromo são essenciais na síntese dos hormônios esteroides, sendo que diversas anomalias no desenvolvimento sexual são causadas por aberrações na síntese de hormônios sexuais progestágenos, andrógenos ou estrógenos, além de problemas de saúde decorrentes de desvios na produção de glicocorticoides e mineralocorticoides, sendo que estas anomalias são resultado de disfunções nos mecanismos das enzimas citocromo P450 responsáveis pela síntese desses hormônios a partir do colesterol (PRAPORSKI et al., 2009).

As enzimas esteroidogênicas ainda são essenciais no processo de diferenciação sexual na embriogênese através dos hormônios esteroides sexuais produzidos por elas, que podem sinalizar tanto a masculinização quanto a feminilização, principalmente em vertebrados a partir da determinação sexual genotípica e principalmente em espécies de anfíbios e répteis que possuem determinação sexual dependente de temperatura (NAKAMURA, 2010).

2.7.1 Citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase)

A enzima citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) se expressa classicamente no córtex da adrenal e gônadas (COSTENARO et al., 2010). Esta é uma enzima microssomal

que sequencialmente catalisa duas distintas reações: a 17- α - hidroxilação de hormônios esteroides e a clivagem de anéis de carbonos C 17-20, convertendo C21 em compostos C19, sendo estes processos essenciais na produção de glicocorticoides e hormônios esteroides sexuais respectivamente (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001; MARTIN et al., 2008; MILLER, 2009; PRAPORSKI et al., 2009).

A distinção entre a 17- α -hidroxilase e a 17,20-liase é funcional e não genética ou funcional, sendo necessário para tanto a presença da enzima citocromo P450c17 e da NADPH citocromo P450 redutase em ambos os casos (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001; SILVA et al., 2002; MILLER, 2009; COSTENARO et al., 2010).

Este mecanismo se dá através da catalise de pregnenolona e progesterona (17- α -hidroxilação) (KNAPCZYK-STWORA et al., 2011) e a reação 17,20-liase de 17 OH-pregnenolona e 17 OH-progesterona para produzir precursores esteroides C19 de andrógenos e estrógenos: a dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001; SILVA et al., 2002; MILLER, 2009; COSTENARO et al., 2010).

A enzima citocromo P450c17 em fêmeas ainda se expressa na zona reticular da glândula adrenal (MILLER, 2009), nas células da teca interna dos folículos ovarianos, células poliédricas tumorais da teca granulosa em éguas, em porções do córtex adrenal e na região de transição córtico-medular (zona fasciculada) (ASSIS NETO et al., 2010).

Em fêmeas gestantes de porcos ocorre imunoexpressão de citocromo P450c17 em células da granulosa, da teca interna, de células estromais e luteínicas dos ovários, sugerindo que os andrógenos, a exemplo da progesterona, contribuem na regulação da gestação nessas espécies. Nestas mesmas espécies foi demonstrado que a enzima citocromo P450c17 se expressam nos ovários e nas células de Leydig dos testículos fetais (KNAPCZYK-STWORA et al., 2011).

Anormalidades no gene CYP17 podem afetar ambos, a esteroidogênese adrenal e gonadal (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001; COSTENARO et al., 2010).

A deficiência de citocromo P450c17 é uma desordem autossomal recessiva e causa um raro caso de hiperplasia adrenal congênita (CAH) (COSTENARO et al., 2010) caracterizada por hipertensão, hipocalemia e desequilibrada produção de hormônios sexuais (MARTIN et al., 2008), além de rabdomiólise e insuficiência renal aguda (SILVA et al., 2002).

No Brasil, a deficiência da 17- α -hidroxilase/17,20-liase é a segunda forma mais comum de CAH (COSTENARO et al., 2010).

Outros fatos relacionados com distúrbios da expressão do citocromo P450c17 são distúrbios no desenvolvimento sexual 46XY em indivíduos machos ou infantilismo sexual em

fêmeas 46XX, além de síndrome de ovário policístico em mulheres (MARTIN et al., 2008; COSTENARO et al., 2010).

Estudos com mulheres com síndrome de ovário policísticos (SOP) demonstram que os níveis aumentados de andrógenos estão relacionados a ação aumentada das enzimas citocromo P450c17 também sobre a teca ovariana aumentando o volume da mesma e mostrando correlação positiva entre volume de estroma ovarianos e níveis séricos de 17 OH-progesterona, além de aumento nos níveis de DHEA testosterona e androstenediona (PINHEIRO; CLAPAUCH, 2001).

Além disso, a deficiência enzimática do citocromo P450c17 é semelhante em indivíduos XX ou XY, sendo que ambos XX e XY possuem genitália externa feminina e ausência dos caracteres sexuais secundários, sendo que no genótipo masculino há ausência de estruturas Müllerianas (SILVA et al., 2002).

Quando combinadas, as deficiências na 17- α -hidroxilase e na 17, 20-liase na adrenal e gônada pode causar no indivíduo o desenvolvimento de hipergonadotrópico hipergonadismo em ambos os sexos, porém as duas vias podem estar presentes isoladamente uma da outra (MILLER, 2009; COSTENARO et al., 2010).

A deficiência parcial nas 17- α -hidroxilase pode causar o desenvolvimento de uma genitália ambígua no nascimento (COSTENARO et al., 2010).

Todos estes sintomas acima descritos estão associados a elevados níveis de progesterona, diminuição na produção de cortisol e hormônios sexuais, causados pela elevação de mineralocorticoides e elevação de hormônio adrenocorticotrófico (aldosterona) (MARTIN et al., 2008; COSTENARO et al., 2010).

2.7.2 Citocromo P450 aromatase

A ação fisiológica e bioquímica dos estrógenos é essencial no dimorfismo anatômico, funcional e comportamental no desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas de mamíferos (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; MCCULLOUGH et al., 2003; MILLER, 2009).

A biossíntese de estrógenos a partir de andrógenos é catalisada por complexos enzimáticos do retículo endoplasmático chamados de aromatases (MCCULLOUGH et al., 2003; GAUCHER et al., 2004; CONLEY; FORD, 2009; CONLEY; CORBIN; HUGHES, 2009; PRAPORSKI et al., 2009), sendo que para a aromatização, os dois principais e mais

importantes substratos são a androstenediona e testosterona (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

As aromatasas parecem ter surgido antes mesmo dos peixes e tetrápodes incluindo os mamíferos e evoluído na medida em que os vertebrados necessitaram de maiores ninhadas para garantir a sobrevivência da espécie (GAUCHER et al., 2004).

O complexo de enzima aromatase é composto por dois polipeptídios, sendo eles o citocromo P450 aromatase que se expressa pelo gene CYP19 e o parceiro redutor NADPH-citocromo P450 redutase (flavoproteína do retículo endoplasmático) (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; GRAHAN-LORENCE et al., 1995; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; MILLER, 2009).

Esse processo é conhecido como aromatização e resulta na formação de um anel fenólico característico de estrógenos, com consequente perda de um grupo angular metil de carbono C19, nos vertebrados (GRAHAN-LORENCE et al., 1995; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Esta reação envolve três passos de hidroxilação e requer o NADPH-citocromo P450 para transferir os redutores equivalentes para a citocromo P450 aromatase, a qual converte substratos esteróides C19 e catalisa a inserção de oxigênio dentro da molécula, resultando na formação de C18 estrógenos (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; GRAHAN-LORENCE et al., 1995; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Para esta reação de catalise de andrógenos a estrógenos, é requerido a transferência de três pares de elétrons e o consumo de três moléculas de oxigênio e três moléculas de NADPH citocromo P450 redutase (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

A citocromo P450 aromatase está presente exclusivamente em células que produzem estrógenos (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993).

Porém, devido a aromatização ser adaptativamente eficiente sobre baixas concentrações de substrato, isto permite a síntese de estrógenos em diversos tecidos não clássicos, nos quais os andrógenos não são sintetizados localmente em altas concentrações (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Na maioria das espécies do filo Chordata, a biossíntese de estrógenos e expressão da citocromo P450 aromatase está limitada no cérebro e gônadas, sobretudo nas células da granulosa de pequenos e pré-ovulatórios folículos ovarianos e em algumas espécies como humanos e roedores, também ocorre no corpo lúteo das fêmeas. Enquanto nos testículos dos machos a atividade da aromatase é encontrada nas células de Sertoli antes da puberdade e

células de Leydig nos adultos, também sendo encontrada em espermatócitos, espermátides alongadas e espermatozóides (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; MILLER, 2009).

Porém em humanos e outros primatas a produção de estrógenos tem distribuição mais ampla, que inclui tecido adiposo e placenta, porém varia de acordo com a idade e região anatômica topográfica (MAHENDRO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001). Na placenta a expressão de aromatase parece estar relacionada com a proteção a exposição a andrógenos em fetos fêmeas, enquanto no tecido adiposo e células estromais a grande quantidade de citocromo P450 aromatase está relacionada com o câncer de mama (GHOSH et al., 2007; GHOSH; HU; LI, 2010). Sendo que, nos cânceres endometriais e de mama, a expressão da citocromo P450 aromatase é maior em regiões de tecido adiposo próximas aos tumores do que em regiões distais aos tumores (MAHENDRO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; DASSEN et al., 2007).

A expressão da aromatase em tecidos adiposos humanos, ainda parece ter a função de manutenção da mineralização e prevenção de osteoporose (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993).

Em equinos, a enzima citocromo P450 aromatase é a responsável pela síntese de estrógenos na placenta (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

O epitélio da vagina de ratas pré-puberes, também sintetizam grande quantidade de estrógenos a partir da testosterona e andronestediona constatado pela alta expressão de citocromo P450 aromatase (LEPHART et al., 1989).

A citocromo P450 aromatase se expressa no retículo adrenal fetal de suínos e trofoectoderma em blastocistos pré-implantados de suínos e equinos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Em humanos a expressão de citocromo P450 aromatase ocorre também no sinciciotrofoblasto da placenta, osteoblastos, fibroblastos da pele, porções vasculares e no fígado fetal (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Nos ossos, a expressão da citocromo P450aromatase ocorre na epífise de ossos em crescimento, onde é responsável pela maturação epifiseal (MILLER, 2009).

No cérebro, a expressão da citocromo P450aromatase ocorre na amígdala, núcleo periventricular preóptico e preóptico medial, além de núcleo superquiasmático, hipotálamo anterior, hipotálamo periventricular anterior, córtex e várias outras regiões (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

A produção extragonadal de estrógenos não é clara, mas parece haver relação entre a sua biossíntese em tecidos adiposos e diversas doenças como: câncer de mama, osteoporose,

amenorréia crônica em mulheres obesas e ginecomastia em homens obesos (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993). Além de tumores de fígado, córtex adrenal e útero e endometriose (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; DASSEN et al., 2007).

A aromatização periférica de andrógenos da adrenal pode ser um importante fator no desenvolvimento de doenças, uma vez que os estrógenos causam profundos efeitos no mecanismo do cálcio e, portanto é usado como terapia na prevenção e combate a osteoporose em mulheres após a menopausa (BERMAN et al., 2003).

Portanto, embora a expressão de citocromo P450 aromatase no tecido adiposo possa suavizar os efeitos da osteoporose em idosos, certamente a sua expressão em outros sítios periféricos pode aumentar a possibilidade de outras doenças (GHOSH; HU; LI, 2010).

Estudos em suínos e equinos demonstram que a P450 aromatase se expressa na teca interna, e membrana granulosa de folículos ovarianos, na adrenal fetal e no trofoectoderma de blastocistos pré-implantados (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Estudos em camundongos demonstram que a formação de estrógeno e a expressão não gonadal de citocromo P450 aromatase pode ter implicações terapêuticas em neuropatologias isquêmicas (MCCULLOUGH et al., 2003).

A enzima citocromo P450 aromatase possui enorme afinidade com androstenediona em relação a outros hormônios andrógenos e por esta razão a aromatização é eficiente mesmo com muito reduzida concentração de substrato e, além disso, a aromatase facilita a síntese de estrógenos em tecidos não clássicos e periféricos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

OBJETIVOS

---

3 OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa estão subdivididos em objetivos gerais e objetivos específicos.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Imunolocalizar as enzimas citocromo P450c17, citocromo P450 aromatase e NADPH citocromo P450 redutase no tecido da mucosa vaginal de *Galea spixii*, associando a expressão das mesmas com a metabolização local de hormônios andrógenos e estrógenos e a ação destes hormônios sobre o epitélio vaginal, e a formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as fases do ciclo estral das fêmeas de preás através de exames de citologia esfoliativa vaginal.

- Analisar a estrutura macro e microscópica da vagina e vulva de fêmeas de preás utilizando amostras de tecido processadas para microscopia de luz nas colorações HE, Picrossírius e Tricromo de Masson.

- Analisar a ultraestrutura da vagina em cortes longitudinais e transversais.

- Analisar microscopicamente a vagina, verificando a expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 e citocromo P450c17 (17-alfa-hidroxilase/17,20-liase) utilizando testes imunohistoquímicos.

- Verificar em qual fase do ciclo estral e em qual camada da mucosa vaginal ocorre a expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 e citocromo P450c17 (17-alfa-hidroxilase/17,20-liase).

MATERIAIS E MÉTODOS

---

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta pesquisa os materiais e métodos foram subdivididos em tópicos e descritos detalhadamente.

4.1 ANIMAIS

O experimento utilizou animais *in vivo* e *post mortem*, sendo que os detalhes estão descritos abaixo.

4.1.1 Procedência e acondicionamento para estudo *in vivo* e *post mortem*

Nesta pesquisa foram utilizadas 15 fêmeas adultas de *Galea spixii* com idade acima de seis meses, as quais foram separadas em três Boxes (1, 2 e 3) contendo cinco animais em cada um durante a análise “*in vivo*” da citologia esfoliativa para estabelecer o ciclo estral da espécie.

Para o grupo controle da análise do ciclo estral foi adicionado um macho com as fêmeas no Box 3.

Todos os Box possuem 2,5 x 2,5m de área, com parede de cimento com altura de 50 cm e o restante telados até altura de 220 cm, com cobertura de telhas de fibrocimento (Figuras 3 e 4).

Todas as fêmeas utilizadas no experimento foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido na cidade de Mossoró-RN, (5^o, 11', 15'' a 18 metros de altitude) sob autorização do IBAMA 2028236/2008 e com autorização do comitê de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/ Campus capital com o protocolo 2400/2011. Além disso, este projeto está vinculado ao SISBIO com o número 16328-1.

Figura 3 - Fotografia demonstrativa de um Box para criação de animais silvestres do CEMAS (Centro de multiplicação de animais Silvestres) da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido) em Mossoró- RN. Fonte: (SANTOS, 2012).

Figura 4 - Esquema da divisão dos grupos experimentais.

Legenda: Notar que em cada um dos Boxes foram acondicionadas cinco fêmeas de preás (esferas pretas) e no Box do grupo controle foi acondicionado um macho (esfera branca) junto com as fêmeas. Fonte: (SANTOS, 2012).

A alimentação dos animais durante o experimento com os animais *in vivo*, foi realizada com frutas, gramíneas, milho em grão e ração para coelho, sendo fornecido água a vontade.

Para a identificação dos animais durante o experimento, utilizou-se tinta preta para coloração de cabelo Garnier Nutrisse® em cada um dos membros de cada um dos animais: membro torácico esquerdo, membro torácico direito, membro pélvico direito, membro pélvico esquerdo e também foram feitas marcações no dorso de um animal de todos os Boxes. (Figura 5).

Todas as fêmeas utilizadas no experimento *post mortem* foram provenientes do controle populacional realizado temporariamente para manutenção do espaço físico recomendado para o bem estar dos animais utilizados para fins de reprodução e conservação da espécie.

Figura 5 - Esquema do método adotado para identificação das fêmeas de preás.

Legenda: Em cada animal de cada Box, foi realizada a marcação com tinta para coloração de cabelos em apenas um dos membros ou no dorso. Fonte: (SANTOS, 2012).

4.1.2 Eutanásia

Para o experimento *post mortem* foram utilizadas apenas 10 fêmeas, sendo que as cinco fêmeas do grupo controle seguiram a gestação pós-acasalamento.

Para a coleta dos materiais para análise histológica e imunohistoquímica, os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (40mg/kg/IM) e cloridrato de

quetamina 1% (60mg/kg/IM) e submetidos à eutanásia pela administração de tiopental sódico a 2,5% (60mg/Kg/IV).

4.2 LABORATÓRIOS

Os testes do exame de panótico rápido para estabelecer o ciclo estral das fêmeas de preás *Galea spixii* foram realizados no laboratório de anatomia e histologia da UFERSA, Mossoró, RN.

Os testes e avaliação de estrutura histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e imunohistoquímica foram realizados nos laboratórios do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/ Campus capital.

4.3 CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL

Para se evitar que fêmeas gestantes participassem do experimento, Todas as fêmeas foram separadas dos machos com no mínimo 20 dias antes do início do mesmo.

A coleta dos esfregaços vaginais foi realizada diariamente em cada uma das 10 fêmeas, no horário entre 7 e 9 horas da manhã nos meses de agosto e setembro de 2011 no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido na cidade de Mossoró-RN.

Todas as coletas e análises através de microscópio óptico foram realizadas pelo mesmo pesquisador, para se evitar alterações no esfregaço e métodos diferentes de leitura dos tipos celulares.

Antes da coleta, diariamente se realizou a lavagem da vulva de cada um dos animais com solução fisiológica e algodão, para se evitar a contaminação do material coletado.

Após a lavagem da genitália externa das fêmeas de preás, era então feito o esfregaço com o auxílio de um *swab* de algodão estéril inserido na vagina no sentido crânio–dorsal e com movimentos de rotação no interior da vagina para colher as células descamativas. As amostras foram transferidas para lâminas de microscopia também por meio de movimentos de rotação em sentidos alternados para que a amostra fosse espalhada uniformemente. Todas as

lâminas foram identificadas com o número do Box (canto superior esquerdo), local da marcação com tinta colorante (canto superior direito) e a data da coleta na parte inferior (Figura 6).

Após a amostra de esfregaço ser espalhada, aguardava-se a completa secagem antes das lâminas serem coradas. Os esfregaços vaginais foram corados pelo método Romanowski modificado, denominado “panótico-rápido” da marca Laborclin®.

Para o método de coloração com panótico rápido, as lâminas com amostras de esfregaço foram submersas em solução n° 1 (Triarilmetano) durante 10 segundos; em seguida as amostras foram submersas na solução n° 2 (Xantenos) durante 10 segundos; e finalizando, as amostras foram submersas na solução n° 3 (Tiazina) durante 10 segundos.

Logo após a coloração, as amostras foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio de luz com aumento de 40X para se estabelecer o ciclo estral das fêmeas de preás, levando em consideração os neutrófilos, células parabasais, células intermediárias pequenas e grandes e células superficiais, relacionadas com a quantidade e frequência de cada tipo celular relativas a fase do ciclo estral (STOCKARD; PAPANICOLAU, 1919; DEANESLY, 1966; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997; TOUMA; PALME; SACHSER, 2001; ALLISON et al., 2008).

As coletas foram realizadas durante dois ciclos completos em cada um dos animais. Após este período, os resultados foram agrupados, as porcentagens celulares de cada coleta foram realizadas, retirando-se a média da frequência celular em cada fase do ciclo de cada animal e em seguida foi feita a somatória de todos os animais e a média geral para os grupos de animais com a mesma duração de ciclo, observando-se o desvio padrão.

Conforme as médias celulares, na terceira análise de citologia esfoliativa vaginal, os animais eram então eutanasiados (seguindo o protocolo de eutanásia descrito acima) em cada uma das fases do ciclo estral.

Figura 6 - Esquema demonstrativo da coleta dos esfregaços vaginais das fêmeas de preás.

Legenda: Observar o sentido em que os esfregaços vaginais foram espalhados pelo swab nas lâminas de microscopia (setas). Fonte: (SANTOS, 2012).

4.4 DISSECAÇÃO E ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a eutanásia os animais foram pesados em balança e mensurados com fita métrica; e então, os animais foram fixados em decúbito dorsal para a dissecação, quando foi então realizada uma incisão pela linha alba na região abdominal utilizando bisturi.

Após a incisão os órgãos genitais foram expostos e extraídos todos juntos para obtenção de dados de relação dos órgãos uns com os outros.

A fotodocumentação macroscópica foi realizada utilizando uma câmera digital Sony MAVICA 3.2 Mp.

Em seguida, a vagina foi mensurada utilizando paquímetro de precisão Mitotoyo ® quando foram extraídas as medidas de comprimento e largura que foram organizadas em uma tabela onde foi extraído a média e desvio padrão das amostras.

4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Foram coletadas amostras de tecido do tubo vaginal em cada uma das fases do ciclo estral das fêmeas de preás provenientes do controle populacional realizado no criatório (CEMAS). As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído tamponado a 4% e posteriormente desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (50% a

100%) e diafanizada em xilol, para posterior inclusão em parafina Histosec-MERCK (TOLOSA et al., 2003).

Foram obtidos cortes dos blocos de parafina com 5 µm de espessura, em micrótomo Leica RM 2155, os quais foram corados em H/E (Hematoxilina/Eosina), Picrossírius e Tricromo de Masson. Em seguida as lâminas foram montadas com cola Permout e lamínulas para observação da morfologia celular. A fotodocumentação microscópica foi realizada através de um fotomicroscópio Leica DM 2000.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nas análises em microscopia eletrônica de varredura, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído (Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc., USA), seguido de lavagem das amostras com tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (Spurr Spurr's kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA) a 1%.

Posteriormente, realizou-se a desidratação do tecido em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e em ponto crítico (Balzers CPD 020).

Os fragmentos de tecidos foram fixados em suportes metálicos (stubs) e em seguida, estes foram revestidos com ouro ("sputtering" Emitech K 550). A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico Leo 435 VP.

4.7 TESTE IMUNOHISTOQUÍMICO PARA CITOCROMO P450, NADPH-CITOCROMO P450 REDUTASE E CITOCROMO P450C17

As amostras da vagina, coletadas em cada uma das fases do ciclo estral, foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado, e posteriormente desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (50% a 100%) e diafanizada em xilol, para posterior inclusão em parafina Histosec-MERCK (TOLOSA et al., 2003), de onde, posteriormente foram obtidos cortes com 5 µm de espessura, em micrótomo Leica RM 2155.

Para a imunolocalização das enzimas citocromo P450c17 e aromatase e NADPH citocromo P50 redutase (anticorpos primários), as amostras foram processadas seguindo o protocolo descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Tabela demonstrativa dos procedimentos utilizados nos testes de imunohistoquímica

Procedimento e reagentes	Repetição (X)	Tempo minutos
		(min) ou horas (hrs)
Desparafinização em estufa 70°	1	3 hrs
Desparafinização em xilol	2	10 min
Hidratação das amostras em álcoois: 100%, 90%, 70%	1	5 min
Fervura em tampão citrato	3	5 min
Hidratação em H ₂ O destilada	1	5 min
Resfriar a temperatura ambiente	1	20 min
Lavagem H ₂ O destilada	2	2 min
Lavagem ICC+ Triton	1	5 min
Bloqueio de peroxidase (peroxidase block)a temperatura ambiente (Kit Dako)	1	10 min
Lavagem ICC+ Triton	3	5 min
Protein Block (kit Dako)	1	10 min
Anticorpo primário (Abcam) para cada uma das enzimas citocromo P450 (c17, aromatase e NADPH redutase)	1	16 hrs
Lavagem ICC+ Triton	3	5 min
Abticorpo secundário (Kit Dako)	1	15 min
Lavagem ICC+ Triton	3	5 min
Solução amplificadora (Kit Dako)	1	15
Lavagem ICC+ Triton	3	5 min
Incubação com DAB (Kit Dako)	1	5 min
H ₂ O destilada	3	5 min
Contra coloração com Hematoxilina	1	1 min
H ₂ O corrente	1	10 min
Desidratação em álcoois (70%, 90%, 100%, 100%)	1	2 min
Diafanização em xilol	2	2 min
Colagem com lamínula	X	X

Para o preparo da solução de ICC Buffer (solução tampão fosfato) com pH 7,2 a 7,4 foram utilizados:

- 1,2 g de Na₂HPO₄ + 0,2 g de K₂HPO₄ + 0,2 g de HCl + 8 g de NaCl para cada 1 L de H₂O destilada.

No momento do procedimento foi adicionado 3 ml de Triton® na solução de ICC.

Para o preparo do tampão citrato foram utilizados:

- 21,1 g de C₆H₈O₇- H₂O para 1 L de H₂O destilada (solução A).

- 29,41 g de C₆H₅O₇Na₃-2H₂O para 1 litro de H₂O destilada (solução B).

No momento do procedimento foi diluído 9 mL de solução A + 41 mL da solução B em 450 mL de H₂O destilada.

Todas as amostras foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Leica DM 2000.

RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

Os resultados encontram-se dividido nos seguintes tópicos: citologia esfoliativa vaginal, morfologia macroscópica dos órgãos da genitália externa, análise macroscópica e morfométrica da vagina, análise histológica da vagina e órgãos genitais externos, microscopia eletrônica de varredura e imunohistoquímica.

5.1 CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL (*in vivo*)

As fêmeas de preás apresentaram ciclos com duração variável entre os animais.

Dessa maneira, ocorreram entre as 10 fêmeas de preás, ciclos variando de 14 a 19 dias entre diferentes animais, cujos dados se encontram na tabela 3 e figura 7.

Tabela 3 - Duração do ciclo estral em *Galea spixii*: média e desvio padrão

Animal	Ciclo 1 (dias)	Ciclo 2 (dias)	Média/ 2 ciclos (dias)
1	15	15	15
2	14	15	14,5
3	17	17	17
4	15	15	15
5	18	18	18
6	15	16	15,5
7	14	14	14
8	15	15	15
9	17	17	17
10	16	19	17,5
Média/ciclo	15,6 ± 1,34	16,1 ± 1,59	
Média/2 ciclos	15,85 ± 1,4 dias		

Figura 7 - Gráfico demonstrativo da porcentagem de ciclos estral nas fêmeas de *Galea spixii* de acordo com sua duração.

Legenda: Observar que ocorreram três ciclos (15%) com 14 dias de duração; oito ciclos (40%) com 15 dias; dois ciclos (10%) com 16 dias; quatro ciclos (20%) com 17 dias; dois ciclos (10%) com 18 dias; e 1 ciclo (5%) com 19 dias. Fonte: (SANTOS, 2012).

Os tipos celulares encontrados nos esfregaços de citologia vaginal das fêmeas de preás silvestres da caatinga nesta pesquisa foram:

Células parabasais, pequenas e arredondadas e com núcleo central, arredondado e predominante sobre o citoplasma; Células intermediárias pequenas, com formato ovoide irregular e com núcleo menor e maior quantidade de citoplasma quando comparado com as células parabasais; Células intermediárias grandes, que possuem núcleo pequeno em relação ao citoplasma e com formato poligonal, parecido com o das células superficiais; E, por fim as células superficiais que apresentam três morfologias diferentes, sendo elas, as células superficiais anucleadas, nucleadas e com núcleo picnótico (Figura 8).

Além disso, foram encontrados nos esfregaços vaginais os leucócitos, sendo que os mais presentes e visíveis foram os neutrófilos (Figura 8).

Os animais do grupo controle apresentaram os mesmos tipos celulares ao longo do ciclo, sendo que, no estro foi constatada inclusive a cópula pela presença de espermatozoides no esfregaço (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografia dos tipos celulares dos esfregaços vaginais de *Galea spixii*.

Legenda: A: células superficiais nucleadas (setas). Proestro; B: célula superficial com núcleo picnótico (seta) e espermatozoides (cabeça de seta). Estro; C: células superficiais anucleadas (seta) e espermatozoides (cabeça de seta). Estro; D: células intermediárias grandes (seta cheia), células intermediárias pequenas (cabeça de seta branca), célula parabasal (seta vazia) e neutrófilos polimorfonucleados (cabeça de seta preta). Metaestro; E: célula intermediária pequena (seta) e aglomerados de neutrófilos (cabeça de seta). Diestro; F: aglomerado de células superficiais (seta). Proestro tardio; G: célula intermediária grande (seta). Início de proestro; H: célula intermediária pequena (setas). Início de proestro. Coloração por panótico rápido. Barra: 100µm.

Os predomínios destas células em relação às fases do ciclo estral estão dispostos detalhadamente na figura 9.

Figura 9 - Gráfico de porcentagem de células do esfregaço vaginal entre as diferentes durações de ciclo estral de *Galea spixii*.

Legenda: O dia 1 compreende o início do estro, enquanto os dias 14, 15, 16, 17, 18 e 19 compreendem o último dia do proestro que antecede o início do estro. Em A: observar o aumento das células parabasais no meio do ciclo, coincidindo com o período de metaestro e diestro. Em B: observar o aumento de células intermediárias pequenas no meio do ciclo, coincidindo com o diestro, metaestro e proestro inicial. . Em C: observar o aumento das células intermediárias grandes no meio do ciclo, coincidindo com o período de metaestro, diestro e proestro. Em D: observar o aumento de células superficiais no início do período de estro e final de proestro. Fonte: (SANTOS, 2012).

5.2 MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS DA GENITÁLIA EXTERNA (*in vivo*)

Pode-se constatar que as fêmeas apresentaram formação e ruptura periódica da membrana de oclusão vaginal e um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra que se abre no topo desse órgão. Além disso, essas fêmeas apresentaram salientes lábios vulvares e ausência de um vestíbulo vaginal (Figura 10).

Figura 10 - Fotografia macroscópica da vulva e clitóris de *Galea spixii*.

Legenda: A: Vulva com a membrana de oclusão vaginal rompida (seta cheia) e clitóris hipertrofiado (seta vazia); B Vulva com a membrana de oclusão vaginal parcialmente desenvolvida (seta cheia) e clitóris hipertrofiado (seta vazia); C: Vulva com a membrana de oclusão vaginal completamente desenvolvida (seta cheia) e clitóris hipertrofiado (seta vazia). Barra: 1cm.

5.3 DATAS DE COLETA, MEDIDAS DOS ANIMAIS E FASES DO CICLO ESTRAL DAS COLETAS

Os dados referentes aos dias de coleta, medidas e fases do ciclo estral das fêmeas utilizadas no experimento *post mortem* estão contidas na tabela 4.

Tabela 4 - Data de coleta, peso, tamanho e fase do ciclo estral das fêmeas de *Galea spixii* utilizadas no experimento *post mortem*

Animal	Data coleta	Peso/g	Tamanho/cm	Fase do ciclo
1	06/09/2011	355	25	diestro
2	07/09/2012	309	21,5	metaestro
3	08/09/2012	441	27	metaestro
4	08/09/2012	284	22	diestro
5	09/09/2012	305	23	Proestro
6	11/09/2012	325	23	Proestro
7	12/09/2012	415	25	Estro
8	13/09/2012	297	24	Proestro
9	13/09/2012	309	21	Diestro
10	15/09/2012	248	20	Estro
Média		320,80	23,50	
Desvio padrão		± 59,27	± 2,13	

5.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA E MORFOMÉTRICA DA VAGINA

A vagina das fêmeas de preás silvestres do semiárido possuem formato e estrutura tubular, intermediando a comunicação entre vulva, cérvix e útero.

A região cranial da vagina é delimitada pelo fórnix vaginal enquanto a região caudal é delimitada pela vulva na altura do óstio vaginal que se abre para a vulva.

Os resultados morfométricos da vagina estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Dados referentes ao comprimento e espessura das vaginas de *Galea spixii*.

Amostra	Comprimento/cm	Espessura/cm
1	3,5	0,5
2	3,3	0,5
3	3,9	0,7
4	3,2	0,4
5	3,5	0,5
6	3,8	0,7
7	3,3	0,6
8	3,4	0,4
9	3,8	0,7
10	3,9	0,7
Média	3,56	0,57
Desvio padrão	0,27	0,13

Figura 11 – Fotografia do aparelho urogenital e adrenal das fêmeas de *Galea spixii*.

Legenda: Órgãos urinários: rins (r), ureteres (ur), vesícula urinária (vu) e uretra que transpassado o clitóris (c); Órgãos genitais: ovários (o), cornos uterinos (cu), ligamento largo do útero (lu), útero (u), vagina (v), clitóris (c) e vulva (vv); e a adrenal (a). Barra: 1cm.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VAGINA E ÓRGÃOS GENITAIS EXTERNOS

A vagina das fêmeas de *Galea spixii* apresenta as camadas: mucosa, submucosa e adventícia.

O epitélio da mucosa é pavimentoso, com alternância de tipos celulares, que variam desde cúbico pavimentoso simples com poucas camadas celulares no diestro e início do proestro, com posterior proliferação das camadas celulares no proestro, atingindo várias camadas celulares, sendo que as camadas mais superficiais vão perdendo o núcleo e se cornificando, antecedendo o estro (Figura 12).

No final do proestro o epitélio da mucosa vaginal apresenta o máximo de células cornificadas e poucas camadas de células intermediárias e parabasais (Figura 12).

No estro, o epitélio apresenta apenas uma ou bem poucas camadas de células cornificadas e ausência de células intermediárias e parabasais, enquanto no metaestro o epitélio deixa de ser cornificado e começa a sofrer ligeira proliferação que deixa de existir no diestro (Figura 12).

Além disso, o tecido vaginal possui diversas pregas longitudinais em toda extensão da vagina (Figuras 13 e 19).

Na camada submucosa da vagina, é observada a presença de tecido conjuntivo denso não modelado, com alguns vasos sanguíneos. Na camada muscular, encontra-se uma camada longitudinal internamente e uma camada transversal externa (Figura 13). Contínua a camada muscular encontra-se a camada adventícia, onde estão presentes tecido adiposo unilocular e vasos sanguíneos (Figura 13).

Na vulva das fêmeas de preás está ausente um vestíbulo, sendo que o óstio da vagina é ocluído ciclicamente pela membrana oclusiva da vagina. Na região do óstio da vagina estão presentes numerosos ductos glandulares na mucosa e na submucosa encontra-se diversas glândulas semelhantes as glândulas perianais (Figuras 13 e 14).

Através de coloração em Tricromo de Masson, é possível diferenciar claramente as camadas musculares e o tecido conjuntivo da submucosa, além da camada adventícia (Figura 14).

Através da coloração de Picrossírius com polarização é possível perceber que predomina o colágeno do tipo I nas camadas do epitélio vaginal, onde pode ser observado bem pouco colágeno do tipo III. (Figura 15).

O epitélio interno da vulva é semelhante ao epitélio da vagina, ou seja, epitélio do tipo pavimentoso não queratinizado. Enquanto externamente a vulva é revestida por epitélio pavimentoso queratinizado e com presença de folículos pilosos e glândulas sebáceas e ácinares (Figuras 16, 17 e 18).

O tecido da vagina na porção mais caudal se torna contínuo com o tecido do clitóris, o qual é transpassado pela uretra, a qual está circundada por numerosas glândulas uretrais revestidas internamente por epitélio que varia de prismático a colunar (Figura 16).

Figura 12– Fotomicrografia das variações do epitélio da mucosa vaginal.

Legenda: Em A: Epitélio em proliferação no início do proestro (seta). HE; Em B: epitélio com grande descamação de células intermediárias (seta). HE; Em C: epitélio se cornificando no meio do proestro (seta). HE; Em D: epitélio perdendo espessura e se cornificando no final do proestro (seta). HE; Em E: epitélio simples cornificado no estro (seta). HE; Em F: epitélio perdendo espessura e células cornificadas no metaestro (seta). HE; Em G: epitélio se tornando menos estratificado no metaestro (seta). HE; Em H: epitélio voltando a se estratificar no diestro (seta). HE. Barras: 200µm.

Figura 13 - Fotomicrografia da vagina de fêmeas de *Galea spixii* em HE.

Legenda: Em A: epitélio (seta fina), tecido conjuntivo denso não modelado (cabeça de seta preta), vasos sanguíneos da submucosa (círculo pontilhado), camada muscular (cabeça de seta vazia), adventícia (seta); Em B: camada muscular circular (C) e camada muscular longitudinal (L); Em C: camada muscular circular (asterisco), camada muscular longitudinal (L), artérias (A) e vasos sanguíneos (V); Em D: epitélio cornificado (seta preta), tecido conjuntivo denso não modelado (asterisco), fina camada muscular circular da submucosa (seta vazia) e fibras elásticas (E); Em E: pregas longitudinais (setas); Em F: mucosa com glândulas (seta), seios venosos (S), submucosa (SM), muscular (M), adventícia (A) e tecido adiposo na adventícia (cabeça de seta). Barras: 200µm.

Figura 14 – Fotomicrografia da vagina de fêmeas de *Galea spixii* em Tricromo de Masson.

Legenda: Em A: mucosa (cabeça de seta), submucosa (SM), camada muscular (M) e adventícia. Barra 200μm. Em B: mucosa (cabeça de seta), submucosa (SM), camada muscular (M) e adventícia. Barra 200μm; Em C: região do óstio da vagina onde se pode notar a mucosa (cabeça de seta), submucosa (SM), adventícia e a camada muscular (M). Barra 500μm; Em D: região do óstio da vagina onde se nota a presença de ductos de glândulas (cabeça de seta) e seios venosos (asterisco) na submucosa (SM) e camada muscular (M). Barra 200μm.

O clitóris apresenta ainda corpo esponjoso e músculo bulbocavernoso do tipo estriado esquelético e está em continuidade com a camada adventícia da vagina (Figura 16).

Figura 15 – Fotomicrografia do óstio da vagina de fêmeas de *Galea spixii* em Picrossírius.

Legenda: Em A: lúmen (cabeça de seta) e fibras colágenas do tipo I (seta). Picrossírius com luz polarizada; Em B: lúmen (cabeça de seta) e fibras colágenas do tipo I (seta). Picrossírius; Em C: fibras colágenas do tipo I (seta) e do tipo III (seta fina). Picrossírius com luz polarizada; Em D: epitélio (seta) e fibras colágenas do tipo I (seta fina). Picrossírius. Barras: 200μm.

Figura 16 - Fotomicrografia da vagina e clitóris de *Galea spixii* em H.E.

Legenda: Em A: epitélio da vagina (cabeça de seta vazia); amada muscular da vagina (seta preta); corpo cavernoso do clitóris (seta vazia); glândulas uretrais (cabeça de seta cheia); uretra (asterisco). Em B: epitélio da uretra (seta); ductos das glândulas uretrais (cabeça de seta). Em C: epitélio externo do clitóris (seta cheia), folículo piloso (seta) e glândula sebácea (asterisco) HE. Barra: 200µm.

Figura 17 – Fotomicrografia da vulva de *Galea spixii* em HE.

Legenda: Em A: epitélio interno da vulva (cabeça de seta) do tipo estratificado queratinizado e glândulas mucosas (seta). Barra: 200µm; Em B: epitélio externo da vulva (cabeça de seta), tecido adiposo (A) e glândulas (setas). Barra: 500µm; Em C: epitélio interno da vulva (cabeça de seta), glândulas mucosas (seta) e camada muscular transversa (MT). Barra: 200µm; Em D: glândulas vulvares (asterisco). Barra: 200µm.

Figura 18 – Fotomicrografia da vulva de fêmeas de *Galea spixii* em Tricromo de Masson.

Legenda: Em A: epitélio queratinizado (seta) externo da vulva e folículo piloso (cabeça de seta). Barra: 200μm; Em B: glândula vulvar (cabeça de seta) e tecido adiposo (A). Barra: 200μm; Em C: camada muscular longitudinal (cabeça de seta), camada muscular transversal (seta fina) e epitélio glandular interno da vulva (seta). Barra: 500μm; Em D: epitélio queratinizado externo da vulva (seta), tecido adiposo (A) e glândulas vulvares (cabeça de seta). 500μm.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Através dos resultados MEV é possível observar as pregas longitudinais da vagina, o clitóris com o óstio uretral se abrindo no topo do órgão e a vagina que se abre na vulva, onde é possível notar a ausência de um vestíbulo da vagina (Figura 19). Além disso, periodicamente nota-se a formação de uma membrana de oclusão vaginal (Figura 20).

Figura 19 – Eletromicrografia de varredura da vagina, vulva e clitóris de *Galea spixii*.

Legenda: Em A: pregas longitudinais (PL) e o clitóris (C). Barras: 1mm; Em B: clitóris (C) e o óstio uretral (seta). Barra: 1mm; Em C: pregas longitudinais (PL). Barra: 300µm; Em D: corte transversal da vagina, onde é possível notar as pregas longitudinais (PL) e o lúmen da vagina (seta). Barra: 300µm.

Figura 20 - Eletromicrografia de varredura da vagina, vulva e clitóris de *Galea spixii*.

Legenda: A: membrana de oclusão vaginal (mov). Barra: 100µm. B: membrana de oclusão vaginal (mov) e vulva da região perineal (vp) e da região clitoriana (v). Barra: 100µm.

5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

5.7.1 Citocromo P450 aromatase

No tecido da vagina, a enzima citocromo P450 aromatase está imunolocalizada no tecido conjuntivo e algumas células mais basais do epitélio no metaestro (Figuras 23, 24 e 25); enquanto no diestro estão presentes principalmente nas células mais basais do epitélio e aparece muito pouco no tecido conjuntivo (Figura 26).

No proestro esta enzima está presente fortemente no tecido conjuntivo próximo do epitélio (Figura 27), enquanto no estro está presente em poucas células basais do epitélio e quase não aparece no tecido conjuntivo (Figura 28).

Para confirmação da imunolocalização da enzima citocromo P450 aromatase na vagina, foi utilizado tecido ovariano como tecido controle, uma vez que este é um tecido endócrino clássico.

Sendo assim, esta enzima está imunolocalizada nas células da camada granulosa e teca interna do folículo ovariano terciário (Figura 21). Também está presente no tecido adiposo durante todo o ciclo estral nas fêmeas de preás silvestres do semiárido (Figura 22).

Figura 21- Fotomicrografia do ovário de fêmeas de *Galea spixii* utilizados como tecido controle com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: folículo (asterisco) e membrana granulosa (seta). Tecido controle de imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 500µm. B: folículo (asterisco) e membrana granulosa (setas). Imunocoloração contra corado com hematoxilina. Barra: 500µm.

Figura 22 - Fotomicrografia do tecido adiposo da camada adventícia da vagina de *Galea spixii* com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: tecido adiposo (asterisco) e camada muscular (m). Tecido controle de imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: tecido adiposo unilocular (asterisco), com imunocoloração positiva (seta) e camada muscular (m). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.

Figura 23 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: epitélio da mucosa (seta pontilhada), tecido conjuntivo (seta) e camada muscular (m) e tecido adiposo na camada adventícia (a). Tecido controle de imunocoloração contra corado em hematoxilina. 500µm. B: epitélio da mucosa (seta pontilhada), tecido conjuntivo (seta) e camada muscular (m) e tecido adiposo na camada adventícia (a). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 500µm.

Figura 24- Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: epitélio (seta), tecido conjuntivo da submucosa (tc), camada muscular (m) e tecido adiposo da camada adventícia (a). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200μm. B: epitélio (seta), tecido conjuntivo da submucosa (tc), camada muscular (m) e tecido adiposo da camada adventícia (a). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200μm

Figura 25 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: células com imunolocalização positiva (seta). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.

Figura 26- Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em diestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: epitélio basal (seta), epitélio superficial (asterisco) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: epitélio basal (seta), epitélio superficial (asterisco) e tecido conjuntivo (tc). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. C: epitélio basal (seta), epitélio superficial (asterisco) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. D: epitélio basal (seta), epitélio superficial (asterisco) e tecido conjuntivo (tc). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm.

Figura 27 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em proestro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: epitélio cornificado, camada basal do epitélio (cabeça de seta) e tecido conjuntivo (asterisco). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200μm. B: epitélio cornificado (seta), camada basal do epitélio (cabeça de seta) e tecido conjuntivo (asterisco). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200μm

Figura 28 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em estro com imunocoloração para citocromo P450 aromatase.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm

5.7.2 Citocromo P450c17

Os resultados para a imunolocalização da enzima citocromo P450c17 na vagina das fêmeas dos preás silvestres do semiárido revelam que esta enzima está presente no epitélio e tecido conjuntivo no metaestro (Figuras 31 e 32); está presente apenas no epitélio no diestro

(Figura 33); no proestro volta a aparecer no tecido conjuntivo juntamente com o epitélio (Figura 34), enquanto no estro parece não haver imunolocalização dessa enzima, embora se constate imunorreatividade em algumas células (Figura 35).

Para confirmação da imunolocalização da enzima citocromo P450c17 na vagina, foi utilizado tecido ovariano como tecido controle, uma vez que este é um tecido endócrino clássico.

Os resultados para imunolocalização da enzima citocromo P450 aromatase constataam a presença dessa enzima na camada granulosa de um folículo ovariano secundário, em alguns folículos primordiais arranjados em grupos (Figura 29) e no tecido adiposo da camada adventícia durante todo o ciclo estral na espécie aqui estudada (Figura 30).

Figura 29 - Fotomicrografia do ovário de fêmeas de *Galea spixii* utilizados como tecido controle com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: folículo (f) e membrana granulosa (seta). Tecido controle de imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: folículo (f), membrana granulosa (seta) e grupamentos de folículos primordiais (círculo) com marcação positiva. Imunocoloração contra corado com hematoxilina. Barra: 200µm.

Figura 30 - Fotomicrografia do tecido adiposo da vagina de *Galea spixii* com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: célula de tecido adiposo unilocular controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: célula de tecido adiposo unilocular (seta). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.

Figura 31 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: células com imunolocalização positiva (setas) no epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm.

Figura 32 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: epitélio (seta). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.
B: células com imunolocalização positiva (seta) no epitélio. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm

Figura 33 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em diestro com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc) com células imunopositivas (seta). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm

Figura 34 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em proestro com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: epitélio superficial cornificado (s) e camada basal do epitélio (cabeça de seta). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: epitélio superficial cornificado (s) e camada basal do epitélio (cabeça de seta) com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm.

Figura 35 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em estro com imunocoloração para citocromo P450c17.

Legenda: A: epitélio (e), camada muscular da submucosa (m) e tecido adiposo da camada adventícia (a). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: epitélio (e), célula imunopositiva no tecido conjuntivo (seta), camada muscular da submucosa (m), tecido adiposo da camada adventícia (a) com células imunopositivas (seta pontilhada). Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm

5.7.3 NADPH citocromo P450 redutase

Os resultados para imunolocalização das enzimas NADPH citocromo P450 redutase na vagina, demonstrou que esta enzima está presente na mucosa, submucosa e camada adventícia durante todo ciclo estral: metaestro (Figura 37), diestro (Figura 38), proestro (Figura 39) e estro (Figura 40), entretanto parecem se concentrar mais no tecido conjuntivo da camada mucosa e no epitélio.

Para confirmação da imunolocalização da enzima NADPH citocromo P450 redutase na vagina, foi utilizado tecido da glândula adrenal como tecido controle, uma vez que este é um tecido endócrino clássico.

Os resultados para imunolocalização das enzimas NADPH citocromo P450 redutase na glândula adrenal de *Galea spixii* revelam a presença desta enzima nas camadas glomerular com maior intensidade e na zona fasciculada em menor intensidade (Figura 36).

Figura 36 - Fotomicrografia da adrenal de *Galea spixii* com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.

Legenda: A: cápsula (seta), zona glomerular (G) e zona fasciculada (F). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: cápsula (seta), zona glomerular (G) e zona fasciculada (F). Tecido controle para imunocoloração com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm

Figura 37 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em metaestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc) com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra:200µm.

Figura 38 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em diestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc) com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.

Figura 39 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em proestro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.

Legenda: A: epitélio (seta) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm. B: epitélio (seta) e tecido conjuntivo (tc) com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 200µm.

Figura 40 - Fotomicrografia da vagina de *Galea spixii* em estro com imunocoloração para NADPH citocromo P450 redutase.

Legenda: A: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc). Tecido controle para imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm. B: epitélio (e) e tecido conjuntivo (tc) com células imunopositivas. Imunocoloração contra corado em hematoxilina. Barra: 100µm.

DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

- Masculinização de fêmeas de mamíferos.

A intersexualidade e outras anomalias na diferenciação sexual, além dos efeitos dos hormônios esteroides sexuais no comportamento sexual anormal, onde fêmeas apresentam fenótipo sexual masculino ou mesmo comportamento masculinizado têm sido descrita em muitas espécies de animais domésticos como ovinos, bovinos, suínos (TICIANELLI et al., 2011), cães (INFORZATO et al., 2009) e equinos (ASSIS-NETO et al., 2010), em modelos biológicos como os *Rattus novergicus* (HERNÁNDEZ-TRISTÁN et al., 1999) e também em espécies de animais silvestres como roedores *Microtus ochrogaster* (SMALE; NELSON; ZUCKER, 1985), hienas *Crocruta crocruta* (YALCINKAYA et al., 1993; GLICKMAN et al., 2006), nos lêmures *Eulemur fulvus rufus* (OSTNER; HEISTERMANN; KAPPELER, 2003) e *Lemur catta* (DREA, 2007) e nas toupeiras *Talpa europaea* (WHITWORTH et al., 1999; RUBENSTEIN et al., 2003).

Destaca-se que a masculinização destas fêmeas vão desde aspectos comportamentais até genitálias externas severamente masculinizadas como no caso das hienas que apresentam um clitóris peniano transpassado pela uretra e ausência de uma abertura vaginal (GLICKMAN et al., 2006), no caso dos lêmures ocorre a presença de um clitóris hipertrofiado mas com presença de vagina (DREA, 2007), enquanto nas toupeiras *Talpa europea*, *T. occidentalis*, *T. romana* e *T. stancovici* e muitas outras espécies da família Talpidae como a toupeira nariz estrela (*Candilura cristata*), apresentam ovo-testículo com uma região intersticial semelhante a dos testículos, com células intersticiais e cordões medulares. Estes ovo-testículos são gônadas bipolares que apresentam características de ambos: testículos e ovários (BARRIONUEVO et al., 2004), e em todos os casos de masculinização estão envolvidos fatores hormonais intrauterinos, sobretudo os relacionados com as enzimas esteroidogênicas, a baixa aromatização de hormônios andrógenos em estrógenos realizados pela enzima citocromo P450 aromatase (WHITWORTH et al., 1999; PLACE et al., 2002; GLICKMAN et al., 2006; DREA, 2007).

No presente estudo pode-se constatar que as fêmeas dos *Galea spixii* a exemplo das hienas acima citadas, também apresentam um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra externamente a vagina, onde se nota a ausência de um vestíbulo vaginal, como descrito também em roedores como *Cavia porcelus* (STOCKARD; PAPANICOLAU, 1919; KELLY; PAPANICOLAU, 1927) e em outros roedores da família caviidae encontrado no Brasil como a *Cuniculus paca* (REIS et al., 2011) e a *Hydrochoerus hidrocaeris* (POCOCK, 1922), e em

Lagostomus maximus (WEIR, 1971) e *Myocastor coypus* (FELIPE; CASTRO; CALLEJAS, 2000; FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001). Embora esta característica também seja necessária para outros roedores que apresentam uma membrana de oclusão vaginal, porém não é descrita em outras espécie de mamíferos.

- Formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal e os hormônios que atuam no tecido vaginal.

A presença do fenômeno de formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal encontrado em *Galea spixii* e descrita também em outros roedores como *Thryonomys swinderianus* (ADDO et al., 2007) encontrados na África, os *Galea musteloides*, *Cavia aperea* (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001), e *Octodon degus* (MAHONEY et al., 2011) encontrados no subcontinente Sul americano e o guinea pig doméstico (*Cavia porcelus*) (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; SELLE, 1922; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997), e os roedores Muridae *Rattus novergicus* (LEPHART et al., 1989), não têm sido bem estudada e estes estudos ainda não levam em consideração os fatores relacionados a participação das enzimas esteroidogênicas neste processo.

Em *Galea spixii* notou-se que a membrana de oclusão vaginal se desenvolve durante o ciclo estral e se rompe no estro semelhante aos achados de Stockard e Papanicolaou (1917) e Deanesly (1966).

Em relação aos hormônios que dominam o fenômeno de formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal, um detalhado estudo realizado por Deanesly (1966) utilizando hormônios esteroides sexuais exógenos em fêmeas de *Cavia porcelus* ovariectomizadas conseguiu elucidar os hormônios responsáveis pelas mudanças epiteliais cíclicas na vagina e a ruptura da membrana de oclusão vaginal, revelando uma alta sensibilidade da vagina a circulação plasmática de hormônios esteroides sexuais.

Neste estudo, Deanesly (1966) mostrou que após o estro, as camadas celulares do epitélio vaginal se proliferam e aumentam a espessura do epitélio e as camadas superficiais vão predominando, cornificando e se mucificando e as camadas basais diminuindo até o último dia do ciclo, semelhante aos resultados encontrados através de histologia com o tecido vaginal das fêmeas de *Galea spixii* do presente estudo. Deanesly (1966) ainda afirma que os hormônios envolvidos nesse processo eram principalmente o estradiol e a androstenediona, além disso, juntos esses dois hormônios são responsáveis pela ruptura da membrana de oclusão vaginal, sendo que a testosterona tem poder inibidor da proliferação celular. Pequenas doses de progesterona também são requeridas para a proliferação celular.

Além disso, em ratas ovariectomizadas, Pessina et al. (2006) encontraram que, os andrógenos facilitam o relaxamento muscular liso da vagina e tem efeito benéfico sobre a inervação, porém a testosterona tem o poder de inibir a proliferação celular do epitélio estrógeno-dependente, enquanto os estrógenos além de estimular a proliferação celular ainda aumenta o fluxo sanguíneo da vagina.

- O delineamento do experimento em *Galea spixii*.

Baseado nesses estudos e nos estudos de Stockard e Papanicolaou (1919), Selle (1922) e Kelly e Papanicolaou (1927), que descreveram detalhadamente os mecanismos morfológicos da abertura e oclusão periódica da vagina de *Cavia porcellus*, além da evidência da presença de enzimas aromatasas que se expressavam de forma crescente e decrescente no epitélio vaginal de *Rattus norvegicus* ao longo do ciclo estral (LEPHART et al., 1989), e os estudos de Berman et al. (2003) com os efeitos da menopausa e os níveis de aromatase na vagina de mulheres, buscamos nesta pesquisa, imunolocalizar na vagina de fêmeas de *Galea spixii*, conhecidos como preás silvestres do semiárido, as enzimas produtoras de hormônios andrógenos (citocromo P450c17) e enzimas produtoras de estrógenos (citocromo P50 aromatase), além da parceira redutora NADPH citocromo P450 redutase (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; PRAPORSKI et al., 2009).

- A caracterização do ciclo estral em *Galea spixii*.

Para a realização da presente pesquisa, primeiramente caracterizou-se o ciclo estral da espécie aqui estudada através de exames de citologia esfoliativa vaginal, conhecido como calpocitologia que foi introduzido por Papanicolau em 1942 (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2007; ALLISON et al., 2008).

Este é um método barato e de grande valia, podendo ser utilizado também para detecção de enfermidades do trato vaginal feminino além de diagnosticar citologicamente a vagina de fêmeas de diversos animais, uma vez que este sofre modificações em função de variações hormonais cíclicas durante o ciclo estral (DEANESLY, 1966; LILLEY EPPING; HAFNER, 1997; DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2007; ALLISON et al., 2008).

Além disso, estudos utilizando a citologia esfoliativa vaginal em *Cavia porcellus* obtiveram os mesmos resultados relativos a duração do ciclo estral quando comparados com método de impedância vaginal (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997), mostrando a validade dos resultados por citologia esfoliativa nos métodos de avaliação do ciclo estral.

Sendo assim, as fêmeas da espécie aqui estudada apresentam ciclo poliestral contínuo (OLIVEIRA et al., 2008), semelhante ao encontrado em fêmeas de roedores como os *Myocastor coypus* (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), *Dasyprocta prymnoph* (GUIMARÃES et al., 2011), *Agouti paca* (GUIMARÃES et al., 2008), *Cuniculus paca* (REIS et al., 2011) e *Rattus norvegicus* (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Os tipos celulares encontrado na citologia esfoliativa vaginal e a bem caracterizada proliferação celular do epitélio demonstrada através de histologia em *Galea spixii* ao longo do ciclo estral no presente estudo, são semelhantes ao encontrado em *Cavia porcellus*, ou seja, células superficiais estão mais presentes no final do proestro e estro, as células intermediárias são mais abundantes no proestro e as células parabasais estão presentes em maior quantidade no metaestro e diestro (DEANESLY, 1966; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997). Nos roedores como o *Cavia porcellus* e *Cavia aperea aperea* (GUIMARÃES; MORERIA; VALE, 1997), nos ratos e no *Myocastor coypus* (FELIPE; CABODEVILA; CALLEJAS, 2001), na *Hydrochoerus hydrochoeris* (BARBOSA et al., 2007), camundongos *Mus musculus* (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2007), *Aguti paca* (GUIMARÃES et al., 2008), e *Dasyprocta prymnoph*, o ciclo sexual é bem caracterizado através dos esfregaços vaginais.

Através de histologia do tecido vaginal, pode-se constatar em *Galea spixii*, que o epitélio vaginal sofre modificações que acompanham as fases do ciclo estral, estas modificações epiteliais fazem com que o epitélio, com uma ou duas camadas no metaestro, vai se estratificando e acrescentando mais camadas celulares no diestro e proestro, quando as camadas celulares mais superficiais vão se cornificando e se soltando para o lúmen vaginal, fazendo com que o epitélio vá perdendo as camadas celulares conforme se aproxima o momento do estro. Sendo que, estes resultados são os mesmos descritos por Selle (1922) nas fêmeas de *Cavia porcellus* e por Weir (1971), nas viscachas (*Lagostamus maximus*),

No presente estudo, é possível notar que o *Galea spixii* possuem ciclo estral curto e regular a exemplo de outros roedores da subfamília caviinae, como observado na tabela 1. É possível notar que as fêmeas de roedores da família caviidae como os *Galea spixii* deste estudo e as fêmeas de *Microcavia australis* (ADRIAN; SACHSER, 2011), *Cavia aperea* (TOUMA; PALME; SACHSER, 2001) e *Cavia porcellus* (SELLE, 1922; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997) apresentam forte semelhança filogenética (PURVES et al., 2005) por possuírem ciclo estral com duração muito parecido, além de possuírem as mesmas características morfológicas da genitália externa, como a membrana de oclusão vaginal e um clitóris hipertrofiado, confirmando a afirmação de Adrian e Sachser (2011) descrevem que as fêmeas dos roedores histricomorfos da família caviidae desenvolvem diversas estratégias

comportamentais para o sucesso da reprodução, que inferem desde as diferenças no dimorfismo sexual até os tipos e duração do ciclo estral.

Este fato pode ser confirmado devido aos membros da família caviidae em muitos habitats da América do Sul serem os maiores itens da dieta da maioria dos predadores, exercendo importante função na cadeia alimentar (ZOGNO et al., 2004).

Devido a esses animais sofrerem forte pressão ecológica, as fêmeas apresentam ciclo estral de curta duração e período gestacional também reduzido (OLIVEIRA et al., 2008) para evitar a exposição a predação e garantir maior número de ninhadas (PURVES et al., 2005), além dos já citados aspectos morfológicos que fazem com que as fêmeas tenham domínio sobre os machos na escolha do parceiro sexual (ADRIAN; SACHSER, 2011), garantindo a seleção sexual de machos mais vigorosos e com melhor genética, e, além disso, as características masculinizadas dos órgãos sexuais encontradas na fêmeas de *Galea spixii* podem garantir vantagens na competição por alimentos como encontrado também em outras espécies de mamíferos como *Crocruta crocruta* e *Eulemur fulvus rufus*, e, além disso, este fato está associado a ambientes hormonais intrauterinos que favorecem a androgenização dessas fêmeas, além de altos níveis de andrógenos durante a vida (YALCINCAYA et al., 1993; DREA, 2007).

Aqui se destaca que estudo comportamental em ambiente natural mostra que as fêmeas de *Galea spixii* possuem hábito de escolher o macho pela qual farão a cópula e apresentam alta agressividade conforme se aproxima o período de estro (ADRIAN; SACHSER, 2011).

Os benefícios dessa androgenização intrauterina das fêmeas parece estarem relacionados com a intensa competição por alimento e a hierarquia social presente nestas espécies (YALCINCAYA et al., 1993; OSTNER; HEISTERMANN; KAPPELER, 2003; GLICKMAN et al., 2006).

Devido a esta dominância, as fêmeas dos *Galea spixii* podem ter vantagens sobre os machos na competição por alimentos para garantir o sucesso da gestação (PURVES et al., 2005).

Futuros estudos relacionados com níveis hormonais, sobretudo de hormônios andrógenos nas fêmeas da espécie aqui estudada poderão comprovar a relação dos níveis hormonais com aspectos comportamentais e a relação de dominância das fêmeas sobre os machos como os estudos hormonais realizados nas fêmeas de toupeira *Talpa europaea* (WHITWORTH et al., 1999), lêmures *Eulemur fulvus rufus* (OSTNER; HEISTERMANN; KAPPELER, 2003) e hienas *Crocruta crocruta* (PLACE et al., 2002; GLICKMAN et al., 2006).

Em relação a exposição intrauterina a hormônios androgênicos, além dos estudos a respeito da masculinização dos órgãos genitais externos estudos em hienas (GLICKMAN et al., 2006; CONLEY et al., 2007), lêmures (DREA, 2007), outros estudos em *Rattus novergicus* revelam que a exposição intrauterina pode retardar a puberdade e haver aumento da incidência de malformações externas genitais e presença de tecido da próstata masculina (HOTCHKISS et al., 2007), confirmando a influência dos hormônios andrógenos na masculinização das fêmeas expostas intrauterinamente a eles.

Além disso, estudos sobre os efeitos da exposição aos androgênios em fêmeas de *Rattus novergicus* revelam alterações na estrutura uterina associada a alterações no ciclo sexual e gestação (CAMARGO et al., 2009), assim como, administração de progestágenos tem o poder de inibir o ciclo estral em *Rattus novergicus* (MENDONÇA et al., 2007), enquanto estudos em humanos mostram que a baixa expressão da enzima citocromo P450 aromatase está relacionada com casos de hiperandrogenismo e tumor juvenil de células da granulosa de ovários (KALFA et al., 2010).

- A expressão das enzimas esteroidogênicas em *Galea spixii*.

Sabe-se que a síntese de estrógenos é totalmente dependente de substratos androgênicos, e esta dependência indica a necessidade de um balanceamento realizado pelas enzimas citocromo P450c17 que catalisam hormônios andrógenos a partir de progestágenos e a enzima citocromo P450 aromatase que catalisa hormônios estrógenos a partir de hormônios andrógenos associados a enzima NADPH citocromo P450 redutase (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; PRAPORSKI et al., 2009).

Portanto neste estudo buscamos após caracterizar o ciclo estral em *Galea spixii*, realizar o teste para imunohistoquímica para a enzima citocromo P450c17, responsável pela catálise metabólica de andrógenos, principalmente androstenediona, uma vez que a enzima citocromo P450aromatase tem grande afinidade por este hormônio para metabolizar hormônios estrógenos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001), e também levando em consideração o fato destas duas enzimas não reagirem entre si, uma vez que estudos demonstram que elas possuem alta especificidade de sítios de ligação na formação de complexos enzimáticos (PRAPORSKI et al., 2009).

Diversos estudos apontam uma diminuição na expressão de citocromo P450 aromatase durante a embriogênese como sendo a causa de uma masculinização da genitália externa em embriões de mamíferos como hienas (GLICKMAN et al., 2006; CONLEY et al., 2007) e

ratos (JOHNSON, 1973; HOTCHKISS et al., 2007) e a ratazana da pradaria (SMALL; NELSON; ZUCKER, 1985).

Porém, estudos envolvendo os hormônios esteroides sexuais e as duas principais enzimas esteroidogênicas envolvidas na diferenciação sexual que são a citocromo P450c17 e a P450 aromatase relacionados com o fenômeno de formação e ruptura na membrana de oclusão vaginal são escassos na literatura, Embora Selle (1922) e Deanesly (1966) já alertavam para influências hormonais neste processo.

No tecido da vagina das fêmeas dos *Galea spixii*, a enzima P450 aromatase está presente no tecido conjuntivo e algumas células mais basais do epitélio no metaestro, enquanto no diestro está presente principalmente nas células mais basais do epitélio e aparece muito pouco no tecido conjuntivo.

No proestro esta enzima está presente fortemente no tecido conjuntivo próximo do epitélio, enquanto no estro está presente em poucas células basais do epitélio e quase não aparece no tecido conjuntivo.

Os resultados aqui encontrados acabam concordando com os resultados do detalhado estudo de Lephart et al. (1989) em *Rattus norvegicus* que também encontrou que a enzima aromatase se expressa durante todo ciclo estral em diferentes proporções no tecido epitelial da vagina desta espécie e podem estar relacionados no mínimo com uma aromatização local de hormônios andrógenos, principalmente a androstenediona, hormônio pelo qual a enzima citocromo P450 aromatase possui enorme afinidade em relação a outros hormônios andrógenos e por esta razão a aromatização é eficiente mesmo com muito reduzida concentração de substrato e, além disso, a aromatase realiza a síntese de estrógenos em tecidos não clássicos e periféricos onde não são produzidos andrógenos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Lephart et al. (1989) encontrou que a atividade de aromatização durante o ciclo estral, tanto no ovário como na vagina é maior no início e final do proestro. Porém na vagina desta espécie, os níveis de aromatase embora existentes, possuem valores menores do que no ovário e sofrem uma queda acentuada no estro e diestro. Este estudo ainda revela que o principal hormônio estrogênico produzido pela enzima citocromo P450 aromatase no ovário a partir da testosterona é o estradiol (E2), porém na vagina não se pode afirmar com certeza quais os hormônios produzidos.

Lephart et al. (1989) ainda sugere que a atividade da aromatase é regulada pela circulação de andrógenos e que o controle dessa aromatização é similar ao encontrado no

ovário e cérebro. Além disso, a circulação de testosterona pode induzir a abertura precoce da membrana de oclusão vaginal sem haver ao mesmo tempo a oocitação.

Estudos em mulheres, Berman et al. (2003) encontraram que a densidade do receptor de androgênio é afetada pela menopausa e sugere que hormônios andrógenos podem desempenhar um papel específico na vagina e as respostas sexuais. Além disso, Berman et al. (2003) cita que estudos com animais demonstram que a testosterona aumenta o relaxamento muscular liso vaginal com mais sucesso que os efeitos dos estrógenos e tem efeitos benéficos sobre a atrofia muscular.

No presente estudo pode-se sugerir que a enzima citocromo P450 aromatase pode estar envolvida na manutenção das pregas vaginais, sensibilidade e aumento da sensibilidade a exemplo do que ocorre em humanos (BERMAN et al., 2003; WITHERBY et al., 2011)

Em humanos a expressão de citocromo P450 aromatase ocorre também no sinciciotrofoblasto da placenta, células estromais adiposas, osteoblastos, fibroblastos da pele, porções vasculares e no fígado fetal (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Porém, a aberração na expressão de citocromo P450 aromatase em humanos e sua localização em tecidos não específicos está relacionada a ginecomastia e precocidade sexual, tumores na mama, testículos, córtex adrenal e útero e a endometriose (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001) e atrofia muscular lisa e perda de sensibilidade vaginal em mulheres pós menopausa devido a menor aromatização de estrógenos, que causa a diminuição da estratificação do epitélio vaginal, além da perda da sensibilidade em decorrência do comprometimento dos terminais nervosos do epitélio e a diminuição da produção de glicogênio causando a queda do pH no fluído vaginal, contribuindo com infecções bacterianas (PESSINA et al., 2006) além da perda de lubrificação (SEMMENS; WAGNER, 1982; SEMMENS et al., 1985; BERMAN et al., 2003).

Por outro lado a imunolocalização das enzimas citocromo P450 aromatase no tecido adiposo da camada adventícia da vagina nas fêmeas de *Galea spixii* do presente estudo não é um fato inédito, devido ao tecido adiposo ser um órgão endócrino e relacionado com a produção de estrógenos, principalmente em tecidos estromais nos casos de câncer de mama em humanos (MAHENDROO; MENDELSON; SIMPSON, 1993; GHOSH et al., 2007; GHOSH; HU; LI, 2010).

Em relação a imunolocalização da enzima citocromo P450c17 no tecido adiposo da vagina das fêmeas aqui estudadas não é narrada em outra espécie aqui comparada.

Os achados na vagina de *Galea spixii* mostram que a imunolocalização das enzimas citocromo P450c17, ocorrem no epitélio e tecido conjuntivo no metaestro. Já no diestro, está

presente apenas no epitélio, já no proestro esta enzima volta a aparecer no tecido conjuntivo juntamente com o epitélio, enquanto no estro parece não haver imunolocalização dessa enzima no tecido vaginal da espécie aqui estudada.

A presença da enzima citocromo P450c17 no tecido vaginal de *Galea spixii*, é relatado pela primeira vez na literatura, sendo que este fato pode estar relacionado a uma metabolização local de 17OH pregnenolona, 17OH progesterona, dehidroepiandrosterona ou mesmo androstenediona (PRAPORSKI et al., 2009; NAKAMURA, 2010), porém futuros estudos relacionados com dosagem desses hormônios através de radioimunoensaio ou Elisa poderão revelar quais os hormônios metabolizados no tecido vaginal na espécie aqui estudada.

A enzima NADPH citocromo P450 redutase está presente no tecido vaginal durante todo o ciclo estral em *Galea spixii* e, portanto certamente está envolvida com a formação de complexos enzimáticos com a enzima citocromo P450c17 na metabolização de hormônios androgênicos e a de hormônios estrogênicos juntamente com a enzima citocromo P450 aromatase (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001). Quando a enzima citocromo P450c17 estava ausente, a enzima NADPH citocromo P450 redutase estava presente e neste caso certamente estava envolvida apenas na metabolização de hormônios estrógenos.

Aqui destacamos que, devido às enzimas citocromo P450c17 e P450 aromatase necessitarem da enzima redutora NADPH citocromo P450 redutase, se ambas as enzimas se expressarem na mesma célula, elas podem competir pelo sítio de ligação com a NADPH citocromo P450 redutase uma vez que ambas as enzimas se situam tanto em frações microssomais do retículo endoplasmático quanto citosol e compartimentos mitocondriais (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001), além da membrana mitocondrial (PRAPORSKI et al., 2009).

Tanto a enzima citocromo P450c17 quanto a enzima citocromo P450 aromatase formam complexos isoladas de alta especificidade e, portanto, as duas enzimas não são capazes de interagir entre si na formação de um único complexo (PRAPORSKI et al., 2009).

Berman et al. (2003) apresentaram a primeira evidência documentada da expressão de aromatase, e 5-alfa RI e 5-alfa R-II, as enzimas necessárias para o metabolismo de testosterona associadas a receptores androgênicos, na vagina humana. Estas descobertas sugerem que elas desempenham um papel na conversão de testosterona para ambos dihidrotestosterona e estradiol na vagina. A presença de mRNA de aromatase sugere que alguns dos efeitos de andrógenos na vagina também são mediadas através da conversão para estrógenos. Os resultados deste estudo revelam diferentes níveis de aromatase na vagina em diferentes mulheres e isto pode ajudar a explicar por que as mulheres na pós-menopausa

recebendo diferentes terapias hormonais apresentam diferentes graus de maturação vaginal e atrofia, por vezes necessitando a adição de terapia tópica de estrógenos.

Os efeitos benéficos da terapia com testosterona tópica na vagina para casos de atrofia muscular vaginal em pacientes com câncer de mama que utilizavam inibidores de aromatase no tratamento da doença e a ação de andrógenos em órgãos-alvo ocorrem de forma direta através da ligação a receptores de andrógeno, ou indiretamente através do receptor de estrógeno após a sua aromatização (BERMAN et al., 2003; WITHERBY et al., 2011).

Talvez estudos em *Galea spixii* ovariectomizadas consigam comprovar a influência das enzimas citocromo P450c17 e P450 aromatase na metabolização local de hormônios andrógenos e estrógenos respectivamente, ou mesmo a influência dessas enzimas com o fenômeno da formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal.

Outros estudos são requeridos para comprovar a androgenização embrionária nas fêmeas dessa espécie, através de mensuração dos níveis de aromatização de estrógenos pela placenta ou mesmo do efeito da administração de inibidores de aromatase nas fêmeas gestantes em relação a ninhada como os realizados em hienas (GLICKMAN et al., 2006; CONLEY et al., 2007).

Além disso, a presença das enzimas citocromo P450c17 e sua parceira redutora NADPH citocromo P450 redutase podem realizar uma metabolização local de hormônios andrógenos que podem ser necessários para a preparação da vagina dessas fêmeas para a cópula, seguindo as modificações epiteliais decorrentes das variações hormonais do ciclo estral, uma vez que os níveis normais de andrógenos podem ser suficientes apenas para suportar a agressividade e para manter a dominância territorial sobre as outras fêmeas e machos do bando, uma vez que, a vagina precisa de pequenas doses de hormônios andrógenos juntamente com hormônios estrógenos metabolizados pela enzima citocromo P450 aromatase para a preparação do tecido vaginal para a cópula e para a abertura da membrana de oclusão vaginal.

- Considerações

As modificações do epitélio vaginal nas fêmeas de *Galea spixii* durante o ciclo estral e a presença de um clitóris hipertrofiado transpassado pela uretra são semelhantes às encontradas em outros roedores da família caviidae como *Cavia porcellus* e *Cuniculus paca*, ocorrendo inclusive o fenômeno da formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal ao longo do ciclo estral descrito também em outras espécies de roedores da subfamília caviinae.

Além disso, um ciclo estral regular e de curta duração parece ser uma característica comum em espécies de roedores da subfamília caviinae expostos a altos níveis de predação.

A agressividade conforme se aproxima o período de estro e a hierarquia e dominância sobre machos descrita nas fêmeas de *Galea spixii* pode estar relacionada com altos níveis de hormônios esteroides andrógenos como apresentado em algumas espécies de mamíferos como lêmures *Eulemur fulvus rufus* e *Lemur catta*, hienas *Crocuta crocuta* e toupeiras do gênero *Talpa*.

Os resultados para imunolocalização das enzimas citocromo P450c17, P450 aromatase e NADPH citocromo P450 redutase encontrados no tecido vaginal de *Galea spixii* parece ser a primeira evidência da presença de enzimas produtoras de hormônios andrógenos e estrógenos descritos na literatura.

Com estes dados pode-se sugerir que ocorre uma metabolização local de hormônios estrógenos no tecido vaginal dessa espécie e este fato pode estar relacionado com a proliferação celular, variação na vascularização e ruptura da membrana de oclusão vaginal, enquanto ao mesmo tempo existe a metabolização de hormônios andrógenos que podem estar relacionados a proliferação celular, aumento da inervação e também pode estar envolvido na formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal nesta espécie, no entanto estudos pormenorizados são necessários para comprovar os resultados.

CONCLUSÕES

---

7 CONCLUSÕES

Constatou-se que o ciclo estral das fêmeas de preás silvestres do semiárido apresenta ciclo estral com duração de $15,85 \pm 1,4$ dias, com a formação e ruptura da membrana de oclusão vaginal durante cada ciclo estral.

A vulva apresenta um clitóris hipertrofiado com o óstio uretral que se abre no topo do mesmo, além de se notar a ausência de um vestíbulo vaginal.

O epitélio da mucosa vaginal sofre modificações proliferativas, se espessando e se adelgando de acordo com a respectiva fase do ciclo estral.

As enzimas citocromo P450 aromatase e NADPH redutase estão imunolocalizadas durante todo o ciclo estral no epitélio e tecido conjuntivo da vagina de *Galea spixii*. Por outro lado, a enzima P450c17 está imunolocalizada no epitélio vaginal durante todas as fases do ciclo estral, exceto no estro.

REFERÊNCIAS

- ADDO, P. G.; AWUMBILA, B.; AWOTWI, E.; ANKRAH, N-A. Reproductive characteristics of the female grasscutter (*Thryonomys swinderianus*) and formulation of colony breeding strategies. **Livestock Research for Rural Development**, v. 19, n. 4, p. 1-16, 2007.
- ADRIAN, O.; SACHSER, N. Diversity of social and mating systems in cavies: a review. **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 39-53, 2011.
- ALLISON, R. W.; THRALL, M. A.; OLSON, P. N. Vaginal cytology. In: CONWELLE, R. L.; TYLER, R. D.; MEINCOTH, J. H.; DeNICOLA, D. B. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3. ed. Toronto: Elsevier, 2008. p. 378-389.
- ASSIS-NETO, A. C.; BALL, B. A.; BROWNE, P.; CONLEY, A. J. Cellular Localization of Androgen Synthesis in Equine Granulosa-theca Cell Tumors: Immunohistochemical Expression of 17 alfa-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 393-401, 2010.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991, 654 p.
- BARBOSA, L. P.; RODRIGUES, M. V.; NEVES, M. M.; MORAIS, D. B.; MELO, B. E. S.; BALARINI, M. K.; COELHO, C. D. P.; MENDONÇA, C. Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 258-266, 2007.
- BARRIONUEVO, F. J.; ZURITA, F.; BURGOS, M.; JIMENÉS, R. Developmental Stages and Growth Rate of the Mole *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 1, p. 20-125, 2004.
- BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Concentrações séricas de progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 32, p. 471-478, 2004.
- BERMAN, J. R.; ALMEIDA, F. G.; JOLIN, J.; RAZ, S.; CHAUDHURI, G.; GONZALEZ-CADAVID, N. F. Correlation of androgen receptors, aromatase, and 5-reductase in the human vagina with menopausal status. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 925-931, 2003.
- BRANCO, E.; LACRETA Jr, A. C. C.; ISHIZAKI, M. N.; PEREIRA, W. L. A.; MENESES, A. M. C.; MUNIZ, J. A. P. C.; FIORETTO, E. T. Morfologia macroscópica e morfometria do aparelho urogenital do macaco de cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758). **Revista Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 197-202, 2010.
- CAMARGO, I. C. C.; GASPAR, A. L. C.; FREI, F.; MESQUITA, S. F. P. Effects of androgenic anabolic steroids on the uterus and reproductive parameters of adult female rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 9, p. 453-460, 2009.
- CARMONA, F. D.; MOTOKAWA, M.; TOKITA, M.; TSUCHIYA, K.; JIMÉNEZ, R.; SANCHÉZ-VILLAGRA, M. R. The evolution of female mole ovotestis evidences high

plasticity of mammalian gonad development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 310, n. 2, p. 259-266, 2008.

CARVALHO, A. F.; LIMA, M. C.; SANTOS, T. C.; BONATELLI, M.; MIGLINO, M. A.; SAMOTO, V. Y.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; PEREIRA, F. T. V.; MARTINS, J. F. P. Análise microscópica do ovário de cateto em fase gestacional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 278-279, 2003.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian Aromatases. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 685-695, 2001.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J. BROWNE, P.; MAPES, S. M.; PLACE, N. J.; HUGHES, A. L.; GLICKMAN, S. E. Placental Expression and Molecular Characterization of Aromatase Cytochrome P450 in the Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*). **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 668-675, 2007.

CONLEY, A.; FORD, J. Comment: The comparative and evolutionary biology of vertebrate aromatase. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 311, n. 5, p. 313, 2009.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HUGHES, A. L. Adaptive evolution of mammalian aromatases: lesson from suiformes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 311, n. 1, p. 346-357, 2009.

CURTIS, H. **Biologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 964 p.

COSTENARO, F.; RODRIGUES, T. C.; KATER, C. E.; AUCHUS, R. J.; PAPARI ZAREEI, M.; CZEPIELEWSKI, M. A. Combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency due to p.R96W mutation in the CYP17 gene in a Brazilian patient. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 54, n. 8, p. 744-748, 2010.

DASSEN, H.; PUNYADEERA, C.; KAMPS, R.; DELVOUX, B.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNEZ, J.; HUSEN, B.; THOLE, H.; DUNSELMAN, G.; GROOTHUIS, P. Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3148-3158, 2007.

DEANESLY, R. Pro-oestrus in the guinea-pig: hormonal stimulation of the vaginal epithelium. **Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 205-212, 1966.

DOMINGUES, S. F. S.; CALDAS-BUSSIÉRE, M. C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução**, v. 30, n. 1/2, p. 57-71, 2007.

DREA, C. M. Sex and seasonal differences in aggression and steroid secretion in Lemur catta: are socially dominant females hormonally 'masculinized'? **Hormones and Behavior**, v. 51, n. 4, p. 555-567, 2007.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 861 p.

FELIPE, A. E.; CASTRO, A.; CALLEJAS, S. S.; CABODEVILA, J. Morphological study of the vagina of the *Myocastor coypus* (coypu). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 18, n.2, p. 231-235, 2000.

FELIPE, A. E.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Characterization of the estrous cycle of the *Myocastor coypus* (coypu) by means of exfoliative colpocytology. **Mastozoología Neotropical/ Journal Neotropical of Mammalogy**, v. 8, n. 2, p. 129-137, 2001.

FRANCO, Y. O.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, v. 5, n. 9, p. 69-76, 2003.

GAUCHER, E. A.; GRADDY, L. G.; LI, T.; SIMMEN, R. C. M.; SIMMEN, F. A.; SCHREBER, D. R.; LIBERLES, D. A. JANIS, C. M.; BENNER, S. A. The planetary biology of cytochrome P450 aromatases. **BMC Biology**, v. 2, n. 19, p. 1-14, 2004.

GEORGE, L. L.; RODRIGUES, C. E. C.; LESQUEVES, R. R. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. 314 p.

GLICKMAN, S. E.; CUNHA, G. R.; DREA, C. M.; CONLEY, A. J.; PLACE, N. J. Mammalian sexual differentiation: lessons from the spotted hyena. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 9, p. 349-356, 2006.

GHOSH, S.; LU, Y.; KATZ, A.; HU, Y.; LI, R. Tumor suppressor BRCA1 inhibits a breast cancer-associated promoter of the aromatase gene (Cyp19) in human adipose stromal cells. **American Journal of Physiological. Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 1, p. 246-252, 2007.

GHOSH, S.; HU, Y, LI, R. Cell Density is a critical determinant of aromatase expression in adipose stromal cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4/5, p. 231-236, 2010.

GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; WHITE, R. E.; PETERSON, J. A.; SIMPSON, E. R. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. **Protein Science**, v. 4, n. 6, p. 1065-1080, 1995.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, N. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos (Ginecologia)**. São Paulo: Varela, 2005. 412 p.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D.; VALE, W.G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico calpocitológico. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 1, p. 55-64, 1997.

GUIMARÃES, D. A. A.; BASTOS, L. V.; FERREIRA, A. C. S.; LUZ-RAMOS, R. S.; OHASHI, O. M.; RIBEIRO, H. L. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 3, p. 531-538, 2008.

GUIMARÃES, D. A.; RAMOS, L. R.; OHASHI, O. M.; GARCIA, G. W.; VALE, W. G. Plasma concentration of progesterone and 17-beta-estradiol of black-rumped agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) during the estrous cycle. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 1, p. 29-35, 2011.

HERNÁNDEZ-TRISTÁN, R.; AREVALO, C.; CANALS, S. Effect of prenatal uterine position on male and female rats sexual behavior. **Physiology & Behavior**, v. 67, n. 3, p. 401-408, 1999.

HOTCHKISS, A. K.; FURRA, J.; MAKYNENB, E. A.; ANKLEYB, G. T.; GRAY-JR, L. E. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague–Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1/3, p. 31–41, 2007.

INFORZATO, G. R.; SANTOS, W. R. M.; CLIMENI, B. S. O.; FILADELPHO, A. L. Pseudo-hermafroditismo em cães- Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2009.

JOHNSON, D. G. Androgenization of the female rat with androstenediol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, n.1, p. 159-161, 1985.

KALFA, N.; MÉDURI, G.; PHILIBERT, P.; PATTE, B. B. B.; THIBAUT, E.; PIENKOWSKI, C.; JAUBERT, F.; MISRAHI, S.; SULTAN, C. Unusual virilization in girls with juvenile granulosa cell tumors of the ovary is related to intratumoral aromatase deficiency. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 74, n. 2, p. 83-91, 2010.

KNAPCZYK-STWORA, K.; STERNAK, M.; DURLEJ, M.; SLOMCZYNSKA, M. Immunolocalization of cytochrome p450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase in the ovary of pregnant pigs and fetal gonads. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 2, p. 71-82, 2011.

KELLY, G. L.; PAPANICOLAOU, G. N. The mechanism of the periodical opening and closing of the vaginal orifice in the guinea-pig. **American Journal of Anatomy**, v. 40, n. 2, p. 387–411, 1927.

LEPHART, E. D.; MATHEWS, D.; NOBLE, J. L.; OJEDA, S. R. The vaginal epithelium of immature rats metabolizes androgens through an aromatase-like reaction: changes during the time of puberty. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 2, p. 259-267, 1989.

LILLEY, K. G.; EPPING, R. J.; HAFNER, L. M. The guinea pig estrous cycle: correlation of vaginal impedance measurements with vaginal cytologic findings. **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 632-637, 1997.

MAHENDROO, M. S.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19463-19470, 1993.

MAHONEY, M. M.; BROOKE V. ROSSI, B. V.; MEGAN H. HAGENAUER, M. H.; LEE, T. M. Characterization of the estrous cycle in *Octodon degus*. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 4, p. 664–671, 2011.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARTIN, M. R.; OLIVEIRA, P. S. L.; COSTA, E. M. F. C.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B. Combined 17 Alpha-Hydroxylase/17,20-Lyase deficiency due to a homozygous 25 BP duplication (NT 4157-4181) at Exon 5 in the CYP17 resulting in a premature stop codon predicted by molecular modeling. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, n. 8, p. 1317-1320, 2008.

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J.; SIMÕES, M. J.; CAMARGO, L. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 313-318, 2007.

MCCULLOUGH, L. D.; KATHLEEN BLIZZARD, K.; SIMPSON, E. R.; OZ, O. K.; HURN, P. D. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8701- 8705, 2003.

MILLER, W. L. Androgens synthesis in adrenarche. **Reviews of Endocrinology Metabolic Disorders**, v. 10, n. 1, p. 03-17, 2009.

MONTEIRO, R. V.; SANTOS, M. R. C.; VIANNA, E. B.; ARAÚJO, T. C. S.; VERONA, C. E.; FEDULLO, L. P. L. Serial clinical, colpo-cytological and endocrinological evaluations of *Cerdocyon thous* bitches from the Rio de Janeiro zoo. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 93-96, 2002.

NAKAMURA, M. The mechanism of sex determination in vertebrates- Are sex steroids the key-factor? **Journal of Experimental Zoology**, v. 313, n.7, p. 381-398, 2010.

NORMAN, W. A.; LITWICK, G. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 558 p.

OLIVEIRA, M. F.; MESS, A.; AMBRÓSIO, C. E.; DANTAS, C. A. G.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea Spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 39, p. 1-8, 2008.

OLIVEIRA, G. B.; RODRIGUES, M. N.; SOUSA, E. S.; ALBUQUERQUE, J. F. G.; MOURA, C. E. B.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1741-1745, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; VALE, A. M.; FAVARON, P. O.; VASCONCELOS, B. G.; OLIVEIRA, G. B.; MIGLINO, M. A.; MESS, A. Development of yolk sac inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). **Placenta**, v. 33, n. 10, p. 878-881, 2012.

OSTNER, J.; HEISTERMANN, M.; KAPPELER, P. M. Intersexual dominance, masculinized genitals and prenatal steroids: comparative data from lemurid primates. **Naturwissenschaften**, v. 90, n. 3, p. 141-144, 2003.

PERCEQUILLO, A.; SANTOS, K.; CAMPOS, B.; SANTOS, R.; TOLEDO, G.; LANGGUTH, A. Mamíferos dos remanescentes florestais de João Pessoa, Paraíba. **Biologia Geral e Experimental**, v. 7, n. 2, p. 17-31, 2007.

- PESSINA, M. A.; HOYT-JR, R. F.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A. M. Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 61–69, 2006.
- PINHEIRO, S. A.; CLAPAUCH, R. Importância da dosagem da 17OH-Progesterona na síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 45, n. 4, p. 361-368, 2001.
- PLACE, N. J.; HOLEKAMP, K. E.; SISK, C. L.; WELDELE, M. L.; COSCIA, E. M.; DREA, C. M.; GLICKMAN, S. E. Effects of prenatal treatment with antiandrogens on luteinizing hormone secretion and sex steroid concentrations in adult spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 5, p. 1405-1413, 2002.
- POCOCK, R. I. On the external characters of some Hystricomorph rodents. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 92, n. 2, p. 365–427, 1922.
- PORTO, R. R. M.; CAVALCANTE, T. V.; DIAS, F. E. F.; ROCHA, J. M. N.; SOUZA, J. A. T. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 521-527, 2007.
- PRAPORSKI, S.; NG, S. M.; NGUYEN, A. D.; CORBIN, C. J.; MECHLER, A.; ZHENG, J.; CONLEY, A. J.; MARTIN, L. L. Organization of cytochrome P450 involved in sex steroids synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33224-33232, 2009.
- PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. **Vida: a ciência da biologia**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2005. v. 2.
- REIS, A. C. G.; GERBASI, S. H. B.; MARTINS, C.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, C. A. Morfologia do sistema genital feminino da paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 183-191, 2011.
- ROMANO, M. A.; MUCCIOLO, R. G.; SILVA, A. E. D. F. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998.
- RUBENSTEIN, N. M.; CUNHA, G. R.; WANG, Y. Z.; CAMPBELL, K. L.; CONLEY, A. J.; CATANIA, K. C.; GLICKMAN, S. E.; PLACE, N. J. Variation in ovarian morphology in four species of New World moles with a peniform clitoris. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 713-719, 2003.
- SAMUELSON, D. A. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007. 546 p.
- SANTIAGO, L. M. A Metabolização no Sistema do Citocromo P450 e a sua Importância em Clínica Geral. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 19, n. 2, p. 121-129, 2003.
- SANTOS, P. R.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; NETO, A. C. Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, n. 6, p. 877-885, 2012.

SCHALLER, O. **Nomenclatura anatômica veterinária ilustrada**. São Paulo: Manole, 1999. 614 p.

SELLE, R. M. Changes in the vaginal epithelium of the guinea-pig during the oestrous cycle. **American Journal of Anatomy**, v. 30, n. 4, p. 429-449, 1922.

SEMMENS, J. P.; WAGNER, G. Estrogen deprivation and vaginal function in postmenopausal women. **The Journal of the American Medical Association**, v. 248, n. 4, p. 445-8, 1982.

SEMMENS, J. P.; TSAI, C. C.; SEMMENS, E. C.; LOADHOLT, C. B. Effects of estrogen therapy on vaginal physiology during menopause. **Obstetrics and Gynecology**, v. 66, n. 1, p. 15-18. 1985.

SHET, M. S.; FISHER, C. W.; TREMBLAY, Y.; BELANGER, A.; CONLEY, A. J.; MASON, J. I.; ESTABROOK, R. W. Comparison of the 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase activities of porcine, guinea pig and bovine P450c17 using purified recombinant fusion proteins containing P450c17 linked to NADPH-P450 reductase. **Drug Metabolism Reviews**, v. 39, n. 2/3, p. 289-307, 2007.

SILVA, D. R. A.; DELFINO, V. D. A.; SOARES, A. E.; VIANA, A. C. A.; MATNI, A. M.; GORDAN, P. A.; GARCIA, W. E.; MOCELIN, A. J. Relato de caso: deficiência de 17 α -hidroxilase, hipocalcemia, rabdomiólise e insuficiência renal aguda. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 4, p. 199-202, 2002.

SILVA, G. C. O.; BERBARE, P. E. B.; ZACCARIOTTI, R. L.; CORRÊA, S. H. R.; OLIVEIRA, C. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Estudo da correlação das características citológicas vaginais e os níveis séricos de estradiol e progesterona em leão africano (*Panthera leo*) mantidos em cativeiro. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 227-232, 2006.

SMALE, L.; NELSON, R. J.; ZUCKER, I. Neuroendocrine responsiveness to oestradiol and male urine in neonatally androgenized prairie voles (*Microtus ochrogaster*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, n. 2, p. 491-6, 1985.

SNOECK, P. P. N.; CRUZ, A. C. B.; CATENACCI, L. S.; CASSANO, C. R. Citologia vaginal de preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 271-275, 2011.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAU, G. N. The vaginal closure membrane copulation and the vaginal plug in the guinea pig, with further considerations of the oestrous rhythm. **Biological Bullettin**, v. 37, p. 222-244, 1919.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

TICIANELLI, J. S.; OLIVEIRA, B. M. M.; ZOGNO, M. A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Intersexo e outras anomalias do desenvolvimento do aparelho reprodutor nos animais domésticos e o auxílio da citogenética para o diagnóstico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.1, p. 26-32, 2011.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Different types of oestrous cycle in two closely related South American rodents (*Cavia aperea* and *Galea musteloides*) with Different Social and Mating Systems. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 791-801, 2001.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.

WEIR, J. B. The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 25, n. 3, p. 365-373, 1971.

WATKINS, P. B. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. Gastroenterology **Clinical Northern American**, v. 21, n. 3, p. 511-526, 1992.

WITHERBY, S.; JOHNSON, J.; DEMERS, L.; MOUNT, S.; LITTENBERG, B.; MACLEAN, C. D.; WOOD, M.; MUSS, H. Topical testosterone for breast cancer patients with vaginal atrophy related to aromatase inhibitors: A phase I/II study. **Oncologist**, v. 16, n. 4, p. 424-431, 2011.

WHITWORTH, D. J.; LICHT, P.; RACEY, P. A.; GLICKMAN, S. E. Testis-like steroidogenesis in the ovotestis of the European Mole, *Talpa europaea*. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 413-418, 1999.

YALCINCAYA, T. M.; SIITERI, P. K.; LICHT, P.; FRANK, L. G. A Mechanism for Virilization of Female Spotted Hyenas in Utero. **Science**, v. 260, n. 5116, p. 1929-1931, 1993.

YAMADA, M. L. A.; KOZICKI, L. E. Contribuição ao estudo do diagnóstico de gestação em *Capra hircus*, através da histologia e citologia do epitélio vaginal. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 6, p. 246-251, 1998.

ZOGNO, M. A.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 228-235, 2004.